



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 11:1-15. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.45>  
Artículo Original. Recibido: 23/06/2021. Aceptado: 17/12/2021. Publicado: 30/12/2021. Clave: e2021-42.  
[https://www.youtube.com/watch?v=xFBCNm\\_zrmo](https://www.youtube.com/watch?v=xFBCNm_zrmo)

## Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* en caninos domésticos del municipio de Cajeme, Sonora, México

Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Rickettsia rickettsii* in domestic canines from the municipality of Cajeme, Sonora, Mexico

Aragón-López Carlos<sup>1\*</sup> ID, Luna-Nevárez Pablo<sup>1</sup> ID, Ortiz-Encinas Veronica<sup>1</sup> ID, Leyva-Corona Jose<sup>1</sup> ID, Cantú-Soto Ernesto<sup>2</sup> ID, Reyna-Granados Javier<sup>1\*\*</sup> ID

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Ciudad Obregón, Sonora, México. <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Ciudad Obregón, Sonora, México. \*Autor Responsable: Aragón-López Carlos. \*\*Autor para correspondencia: Reyna-Granados Javier. Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora. Antonio Caso 2266, Villa Itson, C.P. 85130, Unidad Obregón, Campus Náinari. Ciudad Obregón, Sonora, México. E-mail: carlos.aragon@itson.edu.mx, pluna@itson.edu.mx, veronica.ortiz@itson.edu.mx, jose.leyva@itson.edu.mx, ernesto.cantu@itson.edu.mx, javier.reyna@itson.edu.mx

### RESUMEN

Las zoonosis son un problema mundial con un impacto en la salud animal. Este grupo de enfermedades incluye Ehrlichiosis, Anaplasmosis y Rickettsiosis, en las cuales el vector es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, comúnmente conocida como garrapata marrón del perro. Recientes evidencias indican que este microorganismo actúa como vector de agentes zoonóticos bacterianos como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii*, que han infectado a un gran número de perros y humanos en el norte de México. Este estudio se realizó en el municipio de Cajeme, Sonora, utilizando muestras de sangre (n = 170) de canino. Se utilizaron técnicas moleculares para detectar 92 muestras positivas para *Ehrlichia spp.*, 47 para *Ehrlichia canis*, 18 para *Anaplasma platys* y 2 para *Rickettsia spp.* Además, se encontró coinfección con *Ehrlichia canis* en 12 muestras positivas para *Anaplasma platys*. Se realizó la secuenciación de un positivo de cada patógeno, obteniendo 100% de homología en la plataforma "GenBank" (NCBI). Nuestros resultados enfatizaron la importancia del impacto zoonótico y la coinfección de estas enfermedades. Además, este es el primer estudio que confirma la identificación molecular de las especies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii*, así como su coinfección, en perros domésticos ubicados en el municipio de Cajeme, Sonora.

**Palabras clave:** zoonosis, vectores de Ehrlichiosis, coinfección, técnicas moleculares.

### ABSTRACT

Zoonoses are a worldwide problem with an impact on animal health. This group of diseases include Ehrlichiosis, Anaplasmosis and Rickettsiosis, in which their vector is the tick *Rhipicephalus sanguineus*, commonly known as the brown dog tick. Current evidence indicates this microorganism acts as vector of bacterial zoonotic agents including *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Rickettsia rickettsii*, which have infected a large number of dogs and humans in northern Mexico. This study was conducted in the municipality of Cajeme, Sonora, using blood samples (n=170) from canine. Molecular techniques were used to detect 92 samples positive for *Ehrlichia spp.*, 47 for *Ehrlichia canis*, 18 for *Anaplasma platys* and 2 for



*Rickettsia* spp. In addition, co-infection with *Ehrlichia canis* was found in 12 samples positive for *Anaplasma platys*. Sequencing of one positive of each bacterium was performed, obtaining 100% homology in the "GenBank" platform (NCBI). Our results emphasized the importance of the zoonotic impact and co-infection of these diseases. Moreover, this is the first study confirming the molecular identification of the species *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Rickettsia rickettsii*, as well as their co-infection, in domestic dogs located in the municipality of Cajeme, Sonora.

**Keywords:** zoonoses, Ehrlichiosis vectors, co-infection, molecular techniques.

## INTRODUCCIÓN

Las zoonosis involucran varias enfermedades que representan un problema mundial significativo que afecta a la salud humana y animal (García *et al.*, 2013). Dichas enfermedades incluyen Ehrlichiosis, Anaplasmosis y Rickettsiosis que son causadas por una bacteria gramnegativa la cual se caracteriza por un crecimiento intracelular obligado (género *Rickettsia*, familia Rickettsiaceae; género *Ehrlichia* y *Anaplasma*, familia Anaplasmataceae). Estos se transmiten principalmente por ectoparásitos, incluida la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, o garrapata marrón del perro, que afecta a los vertebrados terrestre (Parola *et al.*, 2009; Alvarez, 2017). Varios estudios han demostrado que estos ectoparásitos actúan como vectores de agentes zoonóticos como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* (Gaunt *et al.*, 2010).

*E. canis* causa una enfermedad zoonótica en perros, gatos y roedores; el humano es una víctima accidental después de ser picado por la garrapata *Rhipicephalus* alojada en estos animales. Después de la infección, el microorganismo se incuba durante 1-2 semanas y entra en 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 (Castro *et al.*, 2004).

*E. canis* se considera una bacteria de distribución cosmopolita. En México, fue descrita por primera vez en 1996 y clasificada como endémica porque se ha reportado en todo el país, pero principalmente en estados del noroeste como Sonora y Sinaloa. En Sonora, *E. canis* se considera una emergencia sanitaria y un problema de salud pública cada vez mayor. Desde 2002 se han reportado más de 600 casos, la gran mayoría en municipios del norte del estado (Álvarez, 2017; Sosa *et al.*, 2013).

Los signos clínicos de la fase aguda de la enfermedad son alteraciones hematológicas, leucopenia, trombocitopenia y anemia leve a moderada; la fase crónica se caracteriza por trombocitopenia, epistaxis, nefropatía, disnea, hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía, meningitis inflamatoria o hemorrágica, entre otras (Ismail *et al.*, 2010).

*A. platys* se distribuye en todo el mundo y también es transmitida por las garrapatas *R. sanguineus*. Se describió por primera vez en 1978 en perros de Estados Unidos (Sánchez & Tesouro, 2001). Esta bacteria pertenece al género *Anaplasma* (Ábrego *et al.*, 2009). Causa trombocitopenia cíclica infecciosa canina. La enfermedad puede presentarse con fiebre, anorexia, petequias, uveítis, linfadenopatía generalizada, leucopenia, anemia moderada y especialmente trombocitopenia, que ocurren en episodios de 3-4 días a intervalos de 7-21 días, lo que eventualmente conduce a trombocitopenia crónica con recuperación lenta (Cicutin *et al.* 2014).



Actualmente se ha detectado *A. platys* con baja incidencia en los estados de Coahuila, Durango y Sonora (Almazán *et al.*, 2016; Murrieta *et al.*, 2017). Como enfermedad zoonótica, Arraga *et al.* (2014) reportaron dos mujeres en Venezuela que estuvieron expuestas a *R. sanguineus*. Posteriormente se observaron cuerpos de inclusión intraplaquetarios sugestivos de *A. platys* en frotis y se amplificó y secuenció el ADN de *A. platys* a partir de sangre completa, aunque el tratamiento con doxiciclina no alivió sus síntomas. Estos casos brindan apoyo adicional para *A. platys* como patógeno zoonótico transmitido por garrapatas, muy probablemente de baja patogenicidad; sin embargo, no se ha confirmado la causa de la enfermedad de *A. platys* en humanos. *R. rickettsii* es el principal agente de fiebre maculosa en las Américas; Se han reportado casos en los EE. UU., Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y Argentina (López *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2010; Lebruna *et al.*, 2011), con una alta tasa de mortalidad debido a la detección tardía del patógeno (Oteo *et al.*, 2014). Se considera que México cuenta con las condiciones ideales para el ciclo de transmisión de la enfermedad, comúnmente asociada a las condiciones de vida (pobreza) ya que la mayoría de los casos presentados han sido detectados en zonas marginadas y rurales de México (Peniche *et al.*, 2015). Estudios recientes demostraron la presencia de *Rickettsia spp.* en garrapatas del estado de Sonora por técnica de PCR (Foley *et al.*, 2019).

Estos patógenos podrían estar presentes previamente en la garrapata, provocando coinfecciones simultáneas en el huésped (es decir, se puede transmitir más de un agente), lo que provocará la enfermedad al mismo tiempo. Esto puede resultar en la manifestación de signos clínicos, de forma más severa e inespecífica, siendo una desventaja para el diagnóstico clínico por parte de los médicos humanos y veterinarios que atienden estos casos (Alleman & Wamsley, 2008; Mutz *et al.*, 2009).

Considerando la importancia zoonótica de estas enfermedades, y que no se han reportado estudios previos en el municipio de Cajeme, Sonora, la presencia de vectores de *E. canis*, *A. platys* y *R. rickettsii* en perros domésticos del municipio son sugestivos a la presencia de estas enfermedades zoonóticas. Por tanto, el objetivo fue la identificación molecular de las especies *E. canis*, *A. platys* y *R. rickettsii* para determinar su coinfección en perros domésticos del municipio de Cajeme, Sonora.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

Se Desarrolló un estudio de tipo observacional descriptivo para detectar la presencia de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii*.

### Área de estudio

El presente trabajo se realizó a partir de muestras de sangre de perros enviadas al Laboratorio de Biología Molecular de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Instituto Tecnológico de Sonora, provenientes de clínicas veterinarias privadas del municipio de Cajeme en el estado de Sonora, México.



## Muestreo experimental

Utilizamos 170 muestras de sangre entera canina con anticoagulante EDTA de un laboratorio de diagnóstico veterinario comercial ubicado en Ciudad Obregón, Sonora. Solo se seleccionaron caninos con diagnóstico clínico presuntivo o positivo para *E. canis*, *A. platys* y *R. rickettsii* con base en la sintomatología presentada y análisis complementarios realizados, como frotis de sangre y hemogramas. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular Veterinaria del ITSON y en todos los casos se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento final, por un período no mayor a 24 horas.

## Procesamiento de muestras de sangre

Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas durante 15 minutos a 3,500 rpm para obtener 200 µl de capa de leucoplaquetaria e iniciar la extracción del material genético.

## Extracción de ADN bacteriano

Para la extracción del ADN de las muestras de sangre, se utilizó el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad, calidad y pureza del ADN se midió en un espectrofotómetro automático BioSpect-nano (Shimadzu), y la integridad se observó en gel de agarosa al 1.5% teñido con 1.5 µl de bromuro de etidio.

## Síntesis de controles positivos

Se utilizó la herramienta BLASTn GenBank® de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) para descargar las secuencias obtenidas de los alineamientos. Dichos alineamientos se realizaron utilizando los cebadores específicos de las bacterias *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii*, en formato FASTA. Se diseñaron los primeros 50 pb (forward) y después 50 pb (reverse) permitiendo así la alineación de los oligonucleótidos. Las secuencias fueron ingresadas a la plataforma IDT (Integrated DNA Technologies) para la síntesis de los fragmentos del gen gBlocks™, facilitando la estandarización para la detección por PCR de cada uno de los microorganismos en estudio.

## Amplificación por PCR

Las muestras de ADN se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los conjuntos de cebadores descritos en la Tabla 1. Inicialmente, los ensayos de PCR se dirigieron a los géneros *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* y *Rickettsia spp.* Las muestras que dieron positivo para cada género se sometieron a una segunda PCR con cebadores específicos para *E. canis*, *A. platys* y *R. rickettsii*.

Para las reacciones se utilizó el kit precargado GoTaq® Flexi DNA Polymerase PCR (Promega) que contiene Green GoTaq®, que sirve como tampón de reacción y solución de carga de gel, lo que permite cargar las reacciones directamente para un análisis rápido y eficiente. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, comenzando con las concentraciones del fabricante: 1X Green GoTaq Buffer 5x, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM para cada dNTP, 0.4 µM de cada cebador, 1.25 u de GoTaq DNA Polymerase, 2 µl de



DNA y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 25 µL. El producto se identificó en gel de agarosa al 1.5% y bromuro de etidio, considerando bandas positivas con el tamaño de cada agente.

**Tabla 1. Cebadores utilizados para detección del agente en muestras de sangre canina**

Agente	Cebadores (5'-3')	Gen	pb	Cebador Tm	Identificación de secuencias	Referencia
<i>Ehrlichia</i> spp.	ECC-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC ECB-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	16S	478	61 °C	MH020203.1	Dawson <i>et al.</i> (1996)
<i>Rickettsia</i> spp.	CS78- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT Cs323- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	<i>gltA</i>	401	48 °C	MG717529.1	Labruna <i>et al.</i> (2004)
<i>Ehrlichia</i> <i>canis</i>	HE- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT ECA- CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA	16S	389	57.4 °C	KX818219.1	Murphy <i>et al.</i> (1998)
Anaplasma platys	pla- HS475- AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA pla-HS1198- CATAGTCTGAAGTGGAGGAC	<i>groEl</i>	724	58 °C	EU516386.1	Inokuma <i>et al.</i> , 2002
<i>Rickettsia</i> <i>rickettsii</i>	Rr190.70p- ATGGCGAATATTTCTCCAAAA Rr190.602n- AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	ompA	530	48 °C	U55822.1	Regnery <i>et al.</i> , 1991

### Secuenciación y análisis *in silico* de fragmentos amplificados

Un producto de PCR de cada microorganismo que resultó positivo, también se purificó con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para corroborar que el fragmento amplificado pertenece a las regiones de interés. Luego, los amplicones fueron secuenciados utilizando el proceso de Sanger realizado en la unidad Langebio Cimvestav Lab Irapuato. Los fragmentos generados con secuencias de nucleótidos representativas de cada bacteria fueron analizados con el programa Snapgene Viewer, y sometidos al algoritmo BLASTn para evaluar el porcentaje de homología de cada agente con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank.

## RESULTADOS

Se observó por medio de electroforesis, una buena integridad de las moléculas de ADN bacteriano extraído, con una cuantificación por espectrofotometría de 248.32 ng/µl en las muestras y una pureza con la relación 260-280 en promedio de 1.85, partiendo de sangre entera con EDTA.

Para la técnica de PCR se utilizó una concentración de 0.5 ng/µl de cada gblocks como controles positivos, obteniendo los pb correspondientes de cada agente, logrando una buena eficiencia y rapidez para la estandarización molecular con las condiciones específicas de cada agente patógeno.



El número de casos positivos y la frecuencia de *Ehrlichis spp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia spp.* obtenidos del análisis molecular de muestras de sangre canina (n=170) se describen en la Tabla 2. De las 92 muestras que dieron positivo para Ehrlichia spp. Se encontraron 12 coinfecciones (Tabla 3) de *Ehrlichia canis* con *Anaplasma platys* (Género EA) (13%).

**Tabla 2. Número de casos e incidencia de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsi* en perros de Cajeme, Sonora, mediante PCR (n=170)**

Agente	PCR	
	Positivos	Frecuencia
<i>Ehrlichia spp</i>	92	54%
<i>Ehrlichia canis</i>	47	28%
<i>Anaplasma platys</i>	18	11%
<i>Rickettsia spp.</i>	2	0.8%

**Tabla 3. Co-infecciones y frecuencia en perros positivos al género EA**

Co-infecciones	PCR
( <i>E. canis</i> / <i>A. platys</i> )	Positivos 92
Positivos	12
Frecuencia	13%

Además, se realizó la secuenciación de una muestra de cada positivo para las diferentes especies de microorganismos analizados, obteniendo cromatogramas puros los cuales fueron analizados con el programa SanpGene Viewer. El análisis de las secuencias en el programa BLASTn (Centro Nacional de Información Biotecnológica) detectó una similitud entre el 99 y el 100% con las secuencias reportadas previamente.

## DISCUSIÓN

Los microorganismos del orden Rickettsiales presentan condiciones zoonóticas denominadas Rickettsiosis, Ehrlichiosis y Anaplasmosis que se deben a varios patógenos de importancia veterinaria que han ganado terreno no solo en nuestra región sino también a nivel mundial (Rodríguez *et al.* 2016), esto se debe principalmente a su vector *Rhipicephalus sanguineus*, siendo la especie de garrapata más reportada y con mayor distribución geográfica (Sosa *et al.*, 2016; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Estos patógenos van en aumento debido a la actividad del ser humano que ha generado cambios radicales en el medio ambiente, favoreciendo las enfermedades transmitidas por vectores (Suthers, 2004) y aumentando su prevalencia a finales de primavera y verano debido a que estos ectoparásitos aumentan su actividad en las altas temperaturas ambientales durante estas estaciones del año, inoculando más rápidamente los hemoparásitos mencionados



(Parola *et al.*, 2009), siendo necesaria la estandarización de técnicas precisas para la detección de estos microorganismos zoonóticos del orden Rickettsiales en las regiones Tropicales y Subtropicales.

Actualmente, el uso de fragmentos del gen gBlocks como controles positivos utilizados en este estudio se ha vuelto popular como estándares y positivos sintéticos para la detección de microorganismos bacterianos. Actualmente se reportaron datos similares en Barcelona donde se utilizaron este tipo de fragmentos para la detección de *E. coli*, *E. faecalis* y *Legionella pneumiphilia* (Cardenas, 2018); además, en Australia dichos fragmentos se utilizaron como estándares en la detección por PCR multiplex de *Taenia spp.* (Ng-Nguyen *et al.*, 2017) Por lo tanto, se recomienda el uso de gBlocks para la estandarización de PCR ya que aumentó la velocidad del bioensayo en la detección debido a la falta de disponibilidad de aislados biológicos.

El estudio fue el primer trabajo mediante PCR para detectar las especies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsi* en muestras de sangre de perros en el municipio de Cajeme y en Sonora, permitiendo conocer la distribución geográfica ampliada de los tres patógenos en el estado. El porcentaje de 54% a al menos un agente patógeno en nuestro estudio concuerda con investigaciones realizadas con herramientas moleculares en algunos países de América del Sur y Central, donde Brasil reportó 69% (Tanikawa *et al.*, 2013), Nicaragua 80% (Wei *et al.*, 2014), Panamá 70,6% (Santamaria *et al.*, 2014), Costa Rica 45% (Rojas *et al.*, 2015) y El Salvador 60% (Miranda *et al.*, 2018). Nuestro porcentaje de prevalencia difirió al compararlo con porcentajes altos de otros países, probablemente por trabajar con perros sin dueño y por estar más en contacto con el vector de las enfermedades al estar asociado a condiciones de vida en zonas marginadas (Peniche *et al.*, 2015). Se ha reportado prevalencia a hemoparásitos en algunos otros estados de México, donde Sinaloa reporta 74.3% (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2013), Coahuila y Durango 41% (Almazán *et al.*, 2016), Yucatán 69% (Díaz *et al.*, 2016), Chihuahua 40% (Escárcega *et al.*, 2018) y Sonora 33% (Murrieta *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, Cajeme presentó el 57% de la infección, posicionando a Sonora en este momento como uno de los principales estados con mayor incidencia en las regiones tropicales y subtropicales donde están presentes los parásitos y el vector.

Con respecto al porcentaje de presencia de cada hemoparásito, evidencio nuestro estudio una prevalencia mayor de *E. Canis* a lo reportado en México (28%), ya que en otro estudio de Sonora en el municipio de San Luis Rio Colorado, se encontró del 8% de infección para *E. Canis* en muestras sanguíneas de 235 perros (Murrieta *et al.*, 2017), en el Estado de Coahuila y Durango 10% en una población de 100 perros sanos infestados con garrapatas (Almazán *et al.*, 2016). En Yucatán se determinó el 36% en una población de 50 perros (10 perros domésticos y 40 en un centro de control de animales), en donde todos los perros positivos fueron de muestras recolectadas del refugio de animales, lo que representa una prevalencia, para este sitio de muestreo del 45% (Path *et al.*, 2015). También existes hallazgo en otros países como Buenos Aires, Argentina, en donde los resultados fueron de igual manera inferiores en una población de 223 perros, obteniendo el 6.7% de positivos a *E. Canis* (Cicutin, 2016), Uruguay es uno de los pocos países en los cuales reporta presencia de otros hemoparásitos, pero no la presencia de *E. Canis*



en una población de 191 perros (Carvalho, 2017). En contraste con Brasil, el porcentaje de nuestro estudio es menor, en donde trabajaron con 472 perros en el noreste brasileiro encontraron el 34.5% de los perros positivos (Silva et al., 2010), siendo superior a nuestros resultados. Colombia representa la mayor zona de alta prevalencia revisada sobre *E. canis* en sus municipios de Palmira (92.8%) y Cartago (90%) (Rojas et al., 2013). No obstante, cabe mencionar que dicho trabajo se realizó en perros callejeros a diferencia de nuestro estudio.

La presencia de *Anaplasma platys* (11%) en nuestro estudio, resultó ser superiores a los reportados en Buenos Aires, Argentina de 223 perros, siendo positivos para *A. platys* el 7.2% (Cicuttin, 2016). En Uruguay de 191 perros resultaron positivos el 4.2% (Carvalho, 2017). También en San Luis Rio Colorado, Sonora en 235 muestras caninas fueron positivas para el 18% (Murrieta et al., 2017). Otras publicaciones muestran valores similares a Costa Rica con el 10% (Wei et al., 2014), Nicaragua el 13% (Rojas et al., 2014), Cuba el 16% (Silva et al., 2016) y el Salvador con 17% (Murrieta, 2017), pero resultaron ser inferior con respecto a Panamá con el 21.3%. En Brasil, en una población de 100 perros, se obtuvo mayor prevalencia para *Anaplasma platys* con el 21% y 9% para *Ehrlichia*, siendo uno de los pocos estudios que difiere en nuestros resultados, ya que, en nuestro trabajo y la mayoría de las investigaciones realizadas en centro y Sudamérica, reportan una menor incidencia de *A. Platys* que de *E. canis*.

El diagnóstico molecular en nuestra investigación de hemoparásitos relacionados a *Ehrlichia* y *Anaplasma* han sido sencillo de identificar a diferencia de la bacteria *Rickettsia rickettsii* con la técnica de PCR a partir de muestras sanguíneas en caninos. Nuestro porcentaje de prevalencia a este agente fue el menor (0.8%) a comparación de *E. canis* y *A. platys*, esto puede deberse a que típicamente se menciona que circula un bajo número de rickettsias en la sangre en ausencia de enfermedad avanzada o infección fulminante (CDC, 2017; Tinoco et al., 2018).

Debido a esto encontramos en la literatura diferentes investigaciones, en su mayoría dirigidas al diagnóstico de *Rickettsia spp.* y *R. rickettsii* en garrapatas *R. sanguineus* en perros de diferentes regiones, como es el caso de Yucatán, seleccionando 28 perros donde se colectaron 106 garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* con una incidencia del 26% (Peniche et al., 2015) En Matamoros, Coahuila, se realizó la técnica de PCR de punto final para el análisis de 100 garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) dando como positivo a *Rickettsia spp* el 4% de las muestras analizadas (Castillo et al., 2015). En Mexicali Baja California, México, se analizaron mediante PCR garrapatas de perro pertenecientes a la morfología de *Rhipicephalus sanguineus*, resultando muestras positivas con 100% de homología a *R. rickettsii* (Foley et al., 2019). Actualmente Sonora lidera las entidades con más reportes de Rickettsiosis en el país, siendo Cajeme una de las principales ciudades con más casos de muerte, a pesar de ser un dato asociado a la salud pública, es importante conocer la incidencia de *R. rickettsii* en animales ((PSS, 2014), dándole mayor importancia a nuestro trabajo, pues no solo se detectó *Rickettsia spp.* Debido a que esas muestras salieron positivas a *R. rickettsii*, con 100% de homología al género con el gen *gltA* y la especie con el gen *OmpA* en muestras de sangre





de 2 perros (n = 170), estos genes son los más utilizados para la detección de la bacteria que causan la fiebre maculosa.

Los resultados obtenidos de los tres agentes, aumenta la alerta y la incidencia de casos asociados a las Rickettsiales en el estado de Sonora transmitida por la garrapata café *Rhipicephalus sanguineus*, que actualmente es el vector más importante de Rickettsiales en México (Labruna, 2009), constituyendo un problema de salud pública, pues se le consideran a *R. rickettsii*, *E. canis* y *A. platys* enfermedad zoonótica por la CDC en el 2017 y que al pasar de los años han adquirido mayor territorio de infección. Como se mencionó anteriormente, estos patógenos pueden estar presentes en la garrapata, provocando co-infecciones simultáneas en el hospedero, es decir más de un solo agente puede ser transmitido, como se demuestra en la presente investigación, encontrando el 13% de co-infección a los agentes *E. canis* y *A. platys*.

La presencia de co-infección con estas bacterias en nuestro estudio no es un hallazgo extraño, ya que son los más comunes en Latinoamérica, basándonos en algunos porcentajes similares obtenidos en Panamá, que reportan una co-infecciones entre *E. canis* y *A. platys* del 7.5% (Santamaría *et al.*, 2014), El Salvador con 4.5% (Miranda *et al.*, 2018) y San Luis Rio Colorado, Sonora con el 12.2% (Murrieta *et al.*, 2017), mencionando que este último es muy semejante a nuestros resultados de co-infección y es del mismo estado.

Es fundamental considerar que el 46% restante de las muestras negativas en el estudio a género y especie, debido a la ausencia de los patógenos o a la presencia de otras enfermedades, ya que en la investigación todas las muestras de sangre provenían de presuntos perros o que manifestaban síntomas clínicos, aunque también puede deberse a la presencia en cantidades bajas e indetectables de los agentes patológicos.

Finalmente, es importante resaltar que las diferencias encontradas entre las muestras positivas a género y negativas a *E. canis*, *A. platys* y *R. rickettsii* probablemente se deban a que los cebadores utilizados en la primera PCR de género (ECC/ ECB) también amplifican otras especies, lo que podría indicar infección por otras especies de Ehrlichia (*E. ewingii* u otras) u otras especies de la familia Anaplasmataceae (*A. phagocytophilum* u otras).

## CONCLUSIONES

El porcentaje de hemoparásitos en perros domésticos reportado en este estudio, posiciona actualmente a Sonora como uno de los principales estados con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales. Los tres agentes fueron detectados por técnicas moleculares en sangre de perros sospechosos de la ciudad de Cajeme, Sonora, identificándose *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* con frecuencias de 28%, 11% y 0.8%, respectivamente. Además, estos tres agentes fueron confirmados por secuenciación. En cuanto a las co-infecciones, solo se detectaron simultáneamente *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* con un 13% de frecuencia. Esta es la primera investigación de identificación molecular en nuestro estado, confirmando la presencia de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* a partir de sangre total de caninos.



## LITERATURA CITADA

ÁBREGO L, Dolz G, Romero J, Bernardo V, Meneses A. 2009. Detección molecular de *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*. 27(2):71-80. ISSN: 0250-5649. <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/4984/4778>

ALLEMAN R, Wamsley HL. 2008. An update on anaplasmosis in dogs. *Veterinary Medicine*. 103.

[https://www.researchgate.net/publication/288555993\\_An\\_update\\_on\\_anaplasmosis\\_in\\_dogs](https://www.researchgate.net/publication/288555993_An_update_on_anaplasmosis_in_dogs)

ALMAZÁN C, González VH, Fernández IG, Cabezas A, Rodríguez 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(2):276-283. ISSN: 1877-959X. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>

ÁLVAREZ R. 2017. Revisión sobre la biología de *Rhipicephalus sanguineus* (ARTHROPODA, CHELICERATA) (LATREILLE, 1806). *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*. 5(1):11-16. <https://doi.org/10.7770/safer-V5N1-art1173>

ARRAGA CM, Parra OC, Hegarty BC, Breitschwerdt EB, Qurollo BA, Berrueta MA. 2014. Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 91(6):1161-1165. ISSN: 0002-9637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>

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>

CARDENAS YI. 2018. Determinación de la contaminación microbiológica del agua de riego aplicando nuevas estrategias de análisis. *Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona*. España. [file:///C:/Users/74998/Downloads/YICY\\_TESIS.pdf](file:///C:/Users/74998/Downloads/YICY_TESIS.pdf)

CARVALHO L, Armua MT, Sosa N, Félix ML, Venzal JM. 2017. *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. *Ticks Tick Borne Dis*. 8(2):241-245. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.005>



CASTILLO M, Cueto SM, Hernández Sergio, Gallegos MA, Valdéz M, Sánchez FJ, Ortega AI. 2015. Detección de *Rickettsia* sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 31(1):80-83. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0065-17372015000100011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372015000100011&lng=es&tlng=es)

CASTRO MB, Machado RZ, Aquino LP, Alessi AC and. Costa MT. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*. 1(119):73-86. ISSN:0304-4017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2017. Rickettsial (spotted & typhus fevers) & related infections, including Anaplasmosis & Ehrlichiosis. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/Rickettsial-spotted-and-typhus-fevers-and-related-infections-including-anaplasmosis-and-ehrlichiosis#5251>.

CICUTTIN G, Vidal P. De Salvo M, Beltrán F, Gury F. 2014. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Revista chilena de infectología*. 31(5):563-568. ISSN: 0716-1018. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000500008>

CICUTTIN G, De Salvo MN, Gury FE. 2016. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks Tick Borne Dis*. 7(5):954-957. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.017>

DÍAZ OC, Bolio ME, Rodríguez RI, Gutiérrez EJ, Pérez C. 2016. Estudio molecular de *Ehrlichia canis* en perros de México: prevalencia de infección y posibles factores asociados. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 3(8):251-257. <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v3n8/2007-901X-era-3-08-00251.pdf>

ESCÁRCEGA AM, Luna BS, Mora A DL, Jiménez F. 2018. Análisis exploratorio de enfermedades *Rickettsiales* transmitidas por garrapatas en perros de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Acta Universitaria*. 28(3):72-78. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1678>



FOLEY J, Tinoco L, Rodriguez M, Estrada J, Fierro M, Mattar E, Peterson A, Pascoe E, Gonzalez Y, Hori S, Armstrong PA, Lopez G, Jacome M, Paddock CD, Zazueta OE. 2019. Unbiased assessment of abundance of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks, canine exposure to spotted fever group rickettsia, and risk factors in Mexicali, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 101(1):22-32. ISSN: 0002-9637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0878>

GAUNT S, Beall MJ, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platy* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*. 3(33). ISSN: 1756-3305. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-33>

GUTIÉRREZ CN, Pérez L, Agrela IF. 2016. Ehrlichiosis canina, Universidad de Carabobo. *Saber*. 28(4):641-665. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S131501622016000400002&lng=es&tng=en](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131501622016000400002&lng=es&tng=en)

HERRERO JA, García E, Hernández, Gómez J. 2010. Infecciones por rickettsias y fiebre Q. *Medicine Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 10(57):3881-3888. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70131-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70131-1)

ISMAIL N, Bloch KC, McBride JW. 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*. 30(1):261-292. ISSN: 0272-2712. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.004>

KRÜTTGEN A, Razavi, S, Imöhl, M. 2011. Real-time PCR assay and a synthetic positive control for the rapid and sensitive detection of the emerging resistance gene New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1 (bla NDM-1). *Medical Microbiology and Immunology*. 200(1):137-141. ISSN: 1432-1831. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0189-y>

LABRUNA MB. 2009. Ecology of rickettsia in South America. *Ann NY Acad Sci*. 1166(1): 156-166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>

LEBRUNA MB, Mattar VS, Nava S, Bermudez M, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, Sousa R, Oteo J and Zavala CJ. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*. 16(2):2435-2457. ISSN-L: 0122-0268. <https://doi.org/10.21897/rmvz.282>

LÓPEZ PJ, Abarca VK, Azócar AT. 2007. Evidencia clínica y serológica de Rickettsiosis canina en Chile. *Revista chilena de infectología*. 24(3):189-193. ISSN: 0716-1018. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182007000300002>



MIRANDA RE, Najarro RA, Navarrete IV. 2018. Detección molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) con sospecha de hemoparásitos en clínicas veterinarias de Santa Tecla y San Salvador, El Salvador. (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).

<http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/16493/>

MURRIETA ZZ, Tinoco L, Hori S, López G, Tamayo AL, Barreras A. 2017. Identificación molecular de especies de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* en perros de la ciudad de San Luis Río Colorado, Sonora, México. VIII Congreso Internacional COMVEPE BC-IICV-UABC de Medicina Veterinaria en Pequeñas Especies Mexicali, B.C.

<https://docplayer.es/65503949-Identificacion-molecular-de-especies-de-los-generos-ehrlichia-y-anaplasma-en-perros-de-la-ciudad-de-san-luis-rio-colorado-sonora-mexico.html>

OTEO JA, Nava S, Sousa R, Mattar S, Venzal J M, Abarca K, Labruna MB, Zavala J. 2014. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las *Rickettsiosis* transmitidas por garrapatas. *Revista chilena de infectología*. 31(1):54-65. ISSN: 0716-1018. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182014000100009>

PAT H, Rodriguez RI, Bolio ME, Villegas SL, Reyes E. 2015. Molecular Diagnosis of *Ehrlichia canis* in Dogs and Ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 52(1):101–104.

<https://doi.org/10.1093/jme/tju010>

PAROLA P, Rovey C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. 2009. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in Tick-borne Rickettsioses. *Emerging Infectious Diseases*. 15(7):1105-1108. ISSN: 1080-6059. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081449>

PENICHE LG, Pérez OC, Dzul RK, Zavala CJ. 2015. Rickettsiosis: Enfermedad Re-Emergente en México. *Ciencia y Humanismo en la salud*. 2(2):76-84. ISSN: 2395-8707. [https://www.researchgate.net/profile/KarlaRossanet/publication/332707900\\_Rickettsiosis\\_Enfermedades\\_ReEmergente\\_en\\_Mexico/links/5cc5446da6fdcc1d49b47593/Rickettsiosis-Enfermedades-Re-Emergente-en-Mexico.pdf](https://www.researchgate.net/profile/KarlaRossanet/publication/332707900_Rickettsiosis_Enfermedades_ReEmergente_en_Mexico/links/5cc5446da6fdcc1d49b47593/Rickettsiosis-Enfermedades-Re-Emergente-en-Mexico.pdf)

PROGRAMA SECTORIAL DE SALUD (PSS). 2014. Prevención y Control de las Rickettsiosis. *Programa de Acción Específico*. México.

[http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\\_PrevencionControlRickettsiosis2013\\_2018.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencionControlRickettsiosis2013_2018.pdf)



RODRÍGUEZ RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad I, Reyes E, Esteve MD, Pérez AA. 2016. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 215:106–113.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.010>

ROJAS A, Rojas D, Montenegro D, Gutiérrez R, Yasur-Landau D, Baneth G. 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic *ehrlichiosis* and the manifestations of co-infection. *Veterinary parasitology*. 199(3-4):121-128.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>

ROJAS A, Rueda A, Díaz D, Mesa NC, Benavides JA, Imbachi K, López R. 2013. Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinaria y Zootecnia*. 7(1):37-48.

[https://www.researchgate.net/profile/Javier\\_Benavides\\_Montano/publication/314533462\\_Identificacion\\_de\\_Ehrlichia\\_canis\\_Donatien\\_Lestoquard\\_Moshkovski\\_mediante\\_PCR\\_anidada/links/58c322b892851c0ccbf14401/Identificacion-de-Ehrlichia-canis-Donatien-Lestoquard-Moshkovski-mediante-PCR-anidada.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Javier_Benavides_Montano/publication/314533462_Identificacion_de_Ehrlichia_canis_Donatien_Lestoquard_Moshkovski_mediante_PCR_anidada/links/58c322b892851c0ccbf14401/Identificacion-de-Ehrlichia-canis-Donatien-Lestoquard-Moshkovski-mediante-PCR-anidada.pdf)

SÁNCHEZ G, Tesouro M. 2001. *Ehrlichiosis. Canis et felis*. 51. ISSN: 1133-2751.

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES20020018360>

SANTAMARIA A, Calzada J, Saldaña A, Yabsley M, Gottdenker N. 2014. Molecular diagnosis and species identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in dogs from Panama, Central America. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 14(5):368-370.

<https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1488>

SILVA CB, Santos HA, Navarrete MG, Ribeiro DU, Gonzalez BC, Zaldivar MF, Pires MS, Peckle M, Costa LD, Vitari LV, Massard CL. 2016. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7(5):938–944. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.012>

SILVA JN, Almeida A B, Boa E C. 2010. Seroprevalence anti-*Ehrlichia canis* antibodies in dogs of Cuiabá, Mato Grosso. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 19(2):108-111. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01902008>

SOSA, CG, Quintero MT, Gaxiola SM, Cota S, Esteve MD, Gordillo MG. 2013. Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic *ehrlichiosis* in dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2013/797019>



SOSA CG, Quintero T, Vargas M, Gordillo P. 2016. Primer análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros y garrapatas de México. Estudio preliminar. *Revista MVZ Córdoba*. 21(3):5569-5576. <https://doi.org/10.21897/rmvz.831>

SUTHERST RW. 2004. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*. 17(1):136-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.136-173.2004>

TANIKAWA A, Labruna MB, Costa A. 2013. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid región of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Res Vet Sci*. 94(3):474-477. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.007>

TINOCO GL, Lomelí MR, Hori S, Stephenson N, Foley J. 2018. Molecular confirmation of Rocky Mountain spotted fever epidemic agent in Mexicali, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 24(9):1723–1725. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171523>

MUTZ I. 2009. Las infecciones emergentes transmitidas por garrapatas. *Annales Nestlé*. 67(3):123-134. ISSN: 0252-8185. <https://doi.org/10.1159/000287275>

NG-NGUYEN D, Stevenson MA, Dorny P, Gabriël S, Vo TV, Nguyen V-AT, Phan TV, Hii SF, Traub RJ. 2017. Comparison of a new multiplex real-time PCR with the Kato Katz thick smear and copro-antigen ELISA for the detection and differentiation of *Taenia spp.* in human stools. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(7):e0005743. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005743>

WEI L, Kelly P, Ackerson K, El-Mahallawy HS, Kaltenboeck B, Wang C. 2014. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia spp.*, *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs on Costa Rica. *Acta Parasitologica*. 60(1). <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0003>