



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 11:1-15. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.45>
Original Artigo. Recebido: 23/06/2021. Aceito: 17/12/2021. Publicado: 30/12/2021. Chave: e2021-42.
https://www.youtube.com/watch?v=xFBCNm_zrmo

Detecção molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii* em caninos domésticos no município 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^{1*} , Luna-Nevárez Pablo¹ , Ortiz-Encinas Veronica¹ ,
Leyva-Corona Jose¹ , Cantú-Soto Ernesto² , Reyna-Granados Javier^{1**} 

¹Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Ciudad Obregón, Sonora. México. ²Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Ciudad Obregón, Sonora. México. *Autor responsável: Aragón-López Carlos. **Autor para correspondência: 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

RESUMO

As zoonoses são um problema global com um impacto na saúde animal. Este grupo de doenças inclui a Ehrlichiosis, Anaplasmosis e Rickettsiosis, em que o vetor é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, comumente conhecido como carrapato marrom do cachorro. Evidências recentes indicam que este microorganismo atua como um vetor de agentes zoonóticos bacterianos como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii*, que infectaram um grande número de cães e humanos no norte do México. Este estudo foi realizado no município de Cajeme, Sonora, utilizando amostras de sangue (n = 170) de caninos. Foram utilizadas técnicas moleculares para detectar 92 amostras positivas para *Ehrlichia* spp., 47 para *Ehrlichia canis*, 18 para *Anaplasma platys* e 2 para *Rickettsia* spp. Além disso, foi encontrada co-infecção com *Ehrlichia canis* em 12 amostras positivas para *Anaplasma platys*. Foi realizada a seqüência dum positivo para cada patógeno, obtendo-se 100% de homologia na plataforma "GenBank" (NCBI). Nossos resultados enfatizaram a importância do impacto zoonótico e da co-infecção destas doenças. Além disso, este é o primeiro estudo que confirma a identificação molecular das espécies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii*, assim como sua co-infecção, em cães domésticos localizados no município de Cajeme, Sonora.

Palavras-chave: zoonose, vetores da Ehrlichiosis, co-infecção, 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.

INTRODUÇÃO

As zoonoses envolvem várias doenças que representam um problema mundial significativo que afeta a saúde humana e animal ([García et al., 2013](#)). Tais doenças incluem Ehrlichiosis, Anaplasmosis e Rickettsiosis que são causadas por uma bactéria gramnegativa caracterizada por crescimento intracelular obrigatório (gênero *Rickettsia*, família *Rickettsiaceae*; gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma*, família *Anaplasmataceae*). Estas são transmitidas principalmente por ectoparasitas, incluindo *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato marrom grosso, que afeta vertebrados moídos ([Parola et al., 2009](#); [Alvarez, 2017](#)). Vários estudos demonstraram que estes ectoparasitas atuam como vetores de agentes zoonóticos, incluindo *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii* ([Gaunt et al., 2010](#)).

E. canis causa uma doença zoonótica em cães, gatos e roedores; então, o humano é uma vítima acidental após ser picado pelo *Rhipicephalus* carrapato hospedado nesses animais. Após a infecção, o microorganismo é incubado durante 1-2 semanas e entra no sangue e vasos linfáticos; então, viaja até o baço, fígado e linfonodos para ser multiplicado pela fusão binária para se espalhar para outros órgãos do corpo ([Castro et al., 2004](#)).

E. canis é considerado como uma bactéria de distribuição cosmopolita. No México, foi descrito pela primeira vez em 1996 e classificado como endêmico por ter sido relatado em todo o país, mas principalmente em estados do noroeste como Sonora e Sinaloa. Em Sonora, *E. canis* é considerado como uma emergência sanitária e uma questão crescente de saúde pública. Desde 2002, mais de 600 casos foram relatados, a grande maioria em municípios do norte do estado ([Álvarez, 2017](#); [Sosa et al., 2013](#)).

Os sinais clínicos da fase aguda da doença são alterações hematológicas, leucopenia, trombocitopenia e anemia leve a moderada; a fase crônica é caracterizada por trombocitopenia, epistaxe, nefropatia, dispnéia, hepatomegalia, esplenomegalia ou linfadenopatia, meningite inflamatória ou hemorrágica, entre outras ([Ismail et al., 2010](#)).

A. platys é distribuída mundialmente e também é transmitida pelos carrapatos *R. sanguineus*. Foi descrita pela primeira vez em 1978 em cães dos Estados Unidos ([Sánchez & Tesouro, 2001](#)). Esta bactéria pertence ao gênero *Anaplasma* ([Ábrego et al., 2009](#)). Ela causa trombocitopenia canina infecciosa cíclica. A doença pode apresentar



febre, anorexia, petéquias, uveíte, linfadenopatia generalizada, leucopenia, anemia moderada e especialmente trombocitopenia, ocorrendo em episódios de 3-4 dias em intervalos de 7-21 dias, eventualmente levando a trombocitopenia crônica com recuperação lenta (Cicuttin *et al.* 2014).

Atualmente, *A. platys* foi detectada com baixa incidência nos estados de Coahuila, Durango e Sonora (Almazán *et al.*, 2016; Murrieta *et al.*, 2017). Como doença zoonótica, Arraga *et al.* (2014) relataram duas mulheres na Venezuela que foram expostas a *R. sanguineus*. Os corpos de inclusão intraplaquetários sugestivos de *A. platys* foram posteriormente observados em esfregaços e o ADN de *A. platys* foi amplificado e sequenciado a partir do sangue total, embora o tratamento com doxiciclina não tenha aliviado seus sintomas. Estes casos fornecem apoio adicional para *A. platys* como um patógeno zoonótico transmitido por carrapatos, provavelmente de baixa patogenicidade; entretanto, a causa da doença de *A. platys* em humanos não foi confirmada.

R. rickettsii é o principal agente da febre maculosa nas Américas; foram relatados casos nos Estados Unidos, Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (López *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2010; Lebruna *et al.*, 2011), com uma alta taxa de mortalidade devido à detecção tardia do patógeno (Oteo *et al.*, 2014). Considera-se que o México tem as condições ideais para o ciclo de transmissão da doença, comumente associadas às condições de vida (pobreza), uma vez que a maioria dos casos apresentados foram detectados em áreas marginalizadas e rurais do México (Peniche *et al.*, 2015). Estudos recentes demonstraram a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos do estado de Sonora pela técnica de PCR (Foley *et al.*, 2019).

Estes patógenos poderiam estar presentes anteriormente no carrapato, causando co-infecções simultâneas no hospedeiro (ou seja, mais dum agente pode ser transmitido), o que estará causando a doença ao mesmo tempo. Isto pode resultar na manifestação de sinais clínicos, de forma mais grave e não específica, sendo uma desvantagem para o diagnóstico clínico pelos médicos humanos e veterinários que atendem a estes casos (Alleman & Wamsley, 2008; Mutz *et al.*, 2009).

Considerando a importância zoonótica destas doenças, e que nenhum estudo prévio foi relatado no município de Cajeme, Sonora, a presença de vetores de *E. canis*, *A. platys* e *R. rickettsii* em cães domésticos no município é sugestiva da presença destas doenças zoonóticas. Portanto, o objetivo foi a identificação molecular das espécies *E. canis*, *A. platys* e *R. rickettsii* para determinar sua co-infecção em cães domésticos no município de Cajeme, Sonora.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo

Foi realizado um estudo observacional descritivo para detectar a presença de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii*.



Área de estudo

O presente trabalho foi realizado a partir de amostras de sangue de cães enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Medicina Veterinária e Zootecnia do Instituto Tecnológico de Sonora, provenientes de clínicas veterinárias privadas da cidade de Cajeme, no estado de Sonora, México.

Amostragem experimental

Utilizamos 170 amostras de sangue total canino com anticoagulante EDTA de um laboratório de diagnóstico veterinário comercial localizado em Ciudad Obregon, Sonora. Somente caninos com diagnóstico clínico presuntivo ou positivo para *E. canis*, *A. platys* e *R. rickettsii* foram selecionados com base na sintomatologia apresentada e análises complementares realizadas, tais como esfregaços de sangue e hemogramas. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular Veterinária da ITSON e em todos os casos foram mantidas a 4 °C até seu processamento final, por um período não superior a 24 horas.

Processamento das amostras de sangue

As amostras foram descongeladas e centrifugadas por 15 minutos a 3.500 rpm, a fim de obter 200 µl de camada de leuco-plaquetária e iniciar a extração do material genético.

Extração do DNA bacteriano

Para a extração de ADN de amostras de sangue, o kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN®) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. A quantidade, qualidade e pureza do ADN foram medidas num espectrofotômetro automático BioSpect-nano (Shimadzu), e a integridade foi observada em gel de agarose de 1,5% corado com brometo de etídeo de 1,5 µl.

Síntese de controles positivos

A ferramenta BLASTn GenBank® do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para baixar as seqüências obtidas a partir dos alinhamentos. Tais alinhamentos foram realizados utilizando os iniciadores específicos das bactérias *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii*, no formato FASTA. Usamos 50 bp a montante do primeiro para frente e 50 bp a jusante do primeiro para trás, onde os oligonucleotídeos foram alinhados. As seqüências foram inseridas na plataforma IDT (Integrated DNA Technologies) para a síntese dos fragmentos do gene gBlocks™, facilitando a padronização para a detecção PCR de cada um dos microorganismos em estudo.



Amplificação por PCR

As amostras de DNA foram analisadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os conjuntos de primers descritos na Tabela 1. Inicialmente, os ensaios de PCR visavam os gêneros *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. As amostras que deram positivo para cada gênero foram submetidas a sua segunda PCR com primers específicos para *E. canis*, *A. platys* e *R. rickettsii*.

Para as reações foi utilizado o kit pré-carregado de PCR GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega) contendo GoTaq® Verde, que serve como tampão de reação e solução de carregamento de gel, permitindo carregar as reações diretamente para uma análise rápida e eficiente. As reações foram executadas em um volume final de 25 µl, começando com as concentrações do fabricante: 1X Buffer GoTaq Verde 5x, 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM para cada dNTP, 0,4 µM de cada primer, 1,25u de GoTaq DNA Polimerase, 2 µl de DNA e H₂O livre de núcleos a 25 µL. O produto foi identificado em gel de agarose a 1,5% e brometo de etídio, considerando faixas positivas com o tamanho de cada agente.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a detecção de agentes em amostras de sangue canino

Agente	Iniciadores (5'-3')	Gen	pb	Iniciador T _m	Sequência ID	Referência
<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 <i>platys</i>	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- AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	<i>ompA</i>	530	48 °C	U55822.1	Regnery <i>et al.</i> , 1991

Seqüenciamento e análise em silico de fragmentos amplificados

Um produto PCR de cada microorganismo que era positivo, também foi purificado com o kit comercial Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega) para corroborar que o fragmento amplificado pertence às regiões de interesse. Os amplificadores foram então sequenciados usando o processo Sanger realizado na unidade Irapuato do Laboratório Langebio Cimvestav. Os fragmentos gerados com seqüências nucleotídicas representativas de cada bactéria foram analisados com o programa Snapgene Viewer, e submetidos ao algoritmo BLASTn para avaliar a porcentagem de homologia de cada agente com as seqüências disponíveis no banco de dados do GenBank.



RESULTADOS

Foi observado por eletroforese que todo o AND extraído mostrou uma boa integridade das moléculas e produziu uma quantificação média por espectrofotometria de 248,32 ng/μl nas amostras da camada leucoplaquetária. Um valor de pureza de 1,85 medido através da razão 260-280 indica o AND como "puro", usando amostras de sangue total com EDTA.

Para a técnica PCR, uma concentração de 0,5 ng/μl de cada bloco foi usada como controle positivo, obtendo os pares de base correspondentes de cada agente, obtendo boa eficiência e velocidade para padronização molecular.

O número de casos positivos e a frequência de *Ehrlichia* spp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia* spp. obtidos a partir da análise molecular de amostras de sangue canino (n=170) estão descritos na Tabela 2. Das 92 amostras que deram positivo para *Ehrlichia* spp. 12 co-infecções (Tabela 3) de *Ehrlichia canis* com *Anaplasma platys* (Genus EA) foram encontradas (13%).

Tabela 2. Número de casos e frequência de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsi*

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

em cães de Cajeme, Sonora, por PCR (n = 170)

Tabela 3. Co-infecções e frequência em cães positivos para o gênero EA

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

Além disso, foi realizado o seqüenciamento de 1 amostra de cada positivo para as diferentes espécies de microorganismos analisados, obtendo cromatogramas puros analisados com o programa SanpGene Viewer. A análise das seqüências no programa BLASTn (National Center for Biotechnology Information) detectou uma similaridade entre 99 e 100% com as seqüências relatadas anteriormente.

DISCUSSÃO

Microorganismos da ordem *Rickettsiales* têm condições zoonóticas chamadas Rickettsiosis, Ehrlichiosis e Anaplasmosis que se devem a vários patógenos de importância veterinária que ganharam terreno não só em nossa região mas também no



mundo inteiro (Rodríguez *et al.* 2016), isto se deve principalmente a seu vetor *Rhipicephalus sanguineus*, sendo a espécie de carrapato mais comumente relatada e com a maior distribuição geográfica (Sosa *et al.*, 2016; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Estes patógenos estão aumentando devido à atividade dos seres humanos que tem gerado mudanças radicais no ambiente, favorecendo as doenças transmitidas por vetores (Suthers, 2004) e aumentando sua prevalência no final da primavera e verão. Devido ao fato de que estes ectoparasitas aumentam sua atividade em altas temperaturas ambientes durante estas estações do ano, inoculando os referidos hemoparasitas mais rapidamente (Parola *et al.*, 2009), exigindo a padronização de técnicas precisas para a detecção destes microorganismos zoonóticos da ordem *Rickettsiales* nas regiões Tropicais e Subtropicais.

Atualmente, o uso de fragmentos do gene gBlocks como controles positivos utilizados neste estudo tornou-se popular como padrões e positivos sintéticos para a detecção de microrganismos bacterianos. Atualmente dados similares foram relatados em Barcelona, onde este tipo de fragmentos foram usados para a detecção de *E. coli*, *E. faecalis* e *Legionella pneumiphilia* (Cardenas, 2018); também, na Austrália tais fragmentos foram usados como padrões na detecção multiplex PCR de *Taenia* spp. (Ng-Nguyen *et al.*, 2017) Portanto, o uso de gBlocks para padronização PCR é recomendado, pois aumentou a velocidade do bioensaio na detecção devido à falta de disponibilidade de isolados biológicos.

O estudo foi o primeiro trabalho utilizando PCR para detectar as espécies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsi* em amostras de sangue de cães no município de Cajeme e em Sonora, permitindo conhecer a distribuição geográfica expandida dos três patógenos no estado. A porcentagem de 54% a pelo menos um agente patogênico em nosso estudo concorda com as investigações realizadas com ferramentas moleculares em alguns países da América do Sul e Central, onde o Brasil reportou 69% ((Tanikawa *et al.*, 2013), Nicarágua 80% (Wei *et al.*, 2014), Panamá 70,6% (Santamaria *et al.*, 2014), Costa Rica 45% (Rojas *et al.*, 2015) e El Salvador 60% (Miranda *et al.*, 2018). Nossa porcentagem de prevalência diferiu quando comparada com as altas porcentagens de outros países, provavelmente porque eles trabalharam com cães sem donos e estando mais em contato com o vetor das doenças por estar associado às condições de vida em áreas marginalizadas (Peniche *et al.*, 2015). A prevalência de hemoparasitas foi relatada em alguns outros estados do México, onde Sinaloa registra 74,3% (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2013), Coahuila e Durango 41% (Almazán *et al.*, 2016), Yucatán 69% (Díaz *et al.*, 2016), Chihuahua 40% (Escárcega *et al.*, 2018) e Sonora 33% (Murrieta *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, Cajeme produziu 57% da infecção, posicionando Sonora neste momento como um dos principais estados com maior incidência em regiões tropicais e subtropicais onde os parasitas e o vetor estão presentes.



Com relação à porcentagem de presença de cada hemoparasita, nosso estudo evidenciou a maior prevalência de *E. canis* relatada no México (28%). Outros estudos relataram resultados menores. No município de San Luis Rio Colorado, 8% da infecção pelo *E. canis* foi encontrada em amostras de sangue de 235 cães (Murrieta *et al.*, 2017); também, no Estado de Coahuila e Durango 10% foi encontrada numa população de 100 cães saudáveis infestados de carrapatos (Almazán *et al.*, 2016). Em Yucatan, 36% foi determinado numa população de 50 cães (10 cães domésticos e 40 num centro de controle de animais), onde todos os cães positivos foram provenientes de amostras coletadas do abrigo de animais, representando uma prevalência de 45% para este local de amostragem (Path *et al.*, 2015). Há também descobertas em outros países como Buenos Aires, Argentina, onde os resultados foram igualmente menores numa população de 223 cães, obtendo 6,7% de positivos para *E. Canis* (Cicutin, 2016), o Uruguai é um dos poucos países que relatou a presença de outros hemoparasitas, mas não a presença de *E. Canis* numa população de 191 cães (Carvalho, 2017). Em contraste com o Brasil, a porcentagem em nosso estudo foi menor porque o trabalho com 472 cães no nordeste brasileiro detectando 34,5% de cães positivos (Silva *et al.*, 2010), a Colômbia representa a maior área com alta prevalência revisada no *E. canis*, principalmente os municípios de Palmira (92,8%) e Cartago (90%) (Rojas *et al.*, 2013). No entanto, vale mencionar que este trabalho foi realizado em cães vadios, ao contrário de nosso estudo.

A presença de *Anaplasma platys* (11%) em nosso estudo, revelou-se superior aos relatados em Buenos Aires, Argentina, de 223 cães, sendo positiva para *A. platys* 7,2% (Cicutin, 2016). No Uruguai, de 191 cães, 4,2% foram positivos (Carvalho, 2017). Também em San Luis Rio Colorado, Sonora em 235 amostras caninas foram positivas para 18% (Murrieta *et al.*, 2017). Outras publicações mostram valores semelhantes aos da Costa Rica com 10% (Wei *et al.*, 2014), Nicarágua 13% (Rojas *et al.*, 2014), Cuba 16% (Silva *et al.*, 2016) e El Salvador com 17% (Murrieta, 2017), mas mostraram ser inferiores em relação ao Panamá com 21,3%. No Brasil, numa população de 100 cães, foi obtida uma prevalência maior para *Anaplasma platys* com 21% e 9% para *Ehrlichia*, sendo um dos poucos estudos que diferem em nossos resultados, uma vez que, em nosso trabalho e na maioria das pesquisas realizadas na América Central e do Sul, eles relatam uma incidência menor de *A. platys* do que *E. canis*.

O diagnóstico molecular em nossa pesquisa de hemoparasitas relacionadas a *Ehrlichia* e *Anaplasma* tem sido fácil de identificar, ao contrário da bactéria *Rickettsia rickettsii* com a técnica de PCR a partir de amostras de sangue em caninos. Nossa porcentagem de prevalência para este agente foi menor (0,8%) em comparação com *E. canis* e *A. platys*, isto pode ser devido ao fato de ser tipicamente mencionado que baixos números de *rickettsia* circulam no sangue na ausência de doença avançada ou infecção fulminante (CDC, 2017; Tinoco *et al.*, 2018).

Devido a isso, encontramos na literatura diferentes investigações, a maioria dirigida ao diagnóstico de *Rickettsia* spp. e *R. rickettsii* em carrapatos *R. sanguineus* em cães de diferentes regiões, como é o caso de Yucatan, selecionamos 28 cães onde 106 carrapatos *Rhipicephalus* foram coletados com uma incidência de 26% (Peniche *et al.*, 2015). Em Matamoros, Coahuila, foi realizada a técnica de PCR para a análise de 100 carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) dando como positivo para *Rickettsia* spp 4% das



amostras analisadas (Castillo *et al.*, 2015). Em Mexicali Baja California, México, carrapatos de cães pertencentes à morfologia do *Rhipicephalus sanguineus* foram analisados por meio de PCR, resultando em amostras positivas com 100% de homologia a *R. rickettsii* (Foley *et al.*, 2019). Atualmente Sonora lidera as entidades com mais relatos de Rickettsiasis no país, sendo Cajeme uma das principais cidades com mais casos de morte, apesar de ser um dado associado à saúde pública, é importante conhecer a incidência de *R. rickettsii* em animais (PSS, 2014), dando maior importância ao nosso trabalho, pois não só *Rickettsia* spp., mas *R. rickettsii* também foi detectado, com 100% de homologia ao gênero com o gene *gltA* e as espécies com o gene *OmpA* em amostras de sangue de 2 cães (n = 170), estes genes são os mais utilizados para a detecção das bactérias que causam a febre maculosa.

Os resultados obtidos com os três agentes, aumentam o alerta e a incidência de casos associados ao *Rickettsiales* no estado de Sonora transmitidos pelo carrapato marrom *Rhipicephalus sanguineus*. É atualmente o vetor mais importante do *Rickettsiales* no México (Labruna, 2009), constituindo um problema de saúde pública, já que *R. rickettsii*, *E. canis* e *A. platys* são considerados doença zoonótica pelo CDC em 2017 e que ao longo dos anos adquiriram maior território de infecção. Como mencionado acima, estes patógenos podem estar presentes no carrapato, causando co-infecções simultâneas no hospedeiro, ou seja, mais de um único agente pode ser transmitido, como demonstrado na presente investigação, encontrando 13% de co-infecção para os agentes *E. canis* e *A. platys*.

A presença de co-infecção com estas bactérias em nosso estudo não é uma descoberta estranha, uma vez que são as mais comuns na América Latina. Em nosso estudo temos porcentagens semelhantes obtidas no Panamá, que relatam uma co-infecção entre *E. canis* e *A. platys* de 7,5% (Santamaría *et al.*, 2014), El Salvador com 4,5% (Miranda *et al.*, 2018) e San Luis Rio Colorado, Sonora com 12,2% (Murrieta *et al.*, 2017), mencionando que esta última é muito semelhante aos nossos resultados de co-infecção e é do mesmo estado.

É essencial considerar que os 46% restantes das amostras negativas no estudo para gênero e espécie, pode ser devido à ausência dos patógenos ou à presença de outras doenças, pois na investigação todas as amostras de sangue vieram de cães presumíveis ou sintomas clínicos manifestados, embora também possa ser devido à presença em quantidades indetectáveis e baixas dos agentes patogênicos.

Finalmente, é importante destacar que as diferenças encontradas entre as amostras positivas para o gênero e negativas para *E. canis*, *A. platys* e *R. rickettsii* se devem provavelmente ao fato de que os primers usados no primeiro gênero PCR (ECC/ECB) também amplificam outras espécies, o que poderia indicar infecção por outras espécies de *Ehrlichia* (*E. ewingii* ou outras) ou outras espécies da família *Anaplasmataceae* (*A. phagocytophilum* ou outras).

CONCLUSÕES

A porcentagem de hemoparasitas em cães domésticos relatada neste estudo, atualmente posiciona o Sonora como um dos principais estados com maior frequência em regiões



tropicales e subtropicales. Todos os três agentes foram detectados por técnicas moleculares no sangue de cães suspeitos da cidade de Cajeme, Sonora, identificando *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii* com frequências de 28, 11 e 0,8%, respectivamente. Além disso, estes três agentes foram confirmados por sequenciamento. Em relação às co-infecções, apenas *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* foram detectados simultaneamente com frequência de 13%. Para nosso conhecimento, esta é a primeira investigação de identificação molecular em nosso estado confirmando a presença de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Rickettsia rickettsii* a partir de sangue total canino. Entretanto, sugerimos mais estudos para explorar a frequência destes agentes infecciosos em outras regiões do estado em Sonora.

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

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

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

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=en&tlng=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- β -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



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

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

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 Americ. *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>