

**Detección molecular e inmunodiagnóstica de bacterias de la Familia
Anaplasmataceae en un albergue canino del Municipio de Caldas.**

Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario

John Fredy Posada Zapata

**Asesores
Santiago Monsalve Buriticá
MVZ, Esp, MSc
Estudiante Doctorado**

**Andrés Felipe Londoño Barbarán
Médico Veterinario MVZ, MSc, cDr.Sc**

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias

Medicina Veterinaria

Caldas-Antioquia

2016

Dedicatoria

Con mucho amor a mis padres por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi carrera, y a mi esposa e hijo por ser el motor de lucha diaria.

A Dios porque sin él, nada de esto fuera posible por darme fuerzas y valor para alcanzar este primer paso de mi carrera como Médico Veterinario.

Agradecimiento

Agradezco principalmente a Dios por darme fortaleza, sabiduría capacidad para concluir mis estudios Universitarios a más de prestarme salud para realizarlo e iluminarme día a día con su inmenso amor.

A mis padres por todo el apoyo incondicional que me brindaron en todo momento de mi carrera profesional, porque sin su apoyo no hubiese logrado alcanzar esta meta y por ser el pilar de mi vida.

A mi esposa y mi hijo por pasar tantas necesidades para que yo pudiese lograr esta meta.

A mis hermanos por su apoyo.

A dos grandes profesores por confiar en mis habilidades y brindarme sus conocimientos profesionales e incondicionales para llevar a cabo este proyecto de investigación: Santiago Monsalve y Andrés Londoño.

De la misma manera agradezco al profesor Víctor Molina quien me ayudo con el muestreo de los animales para este proyecto de investigación.

De manera especial a Duban González por sus conocimientos de normas APA, igualmente agradezco a Azucena Cabrera y Karine Londoño por su ayuda en el procesamiento de muestras y al grupo de investigación CENTAURO de la Universidad de Antioquia en cabeza del Doctor Juan David Rodas.

En general a todos los que de una u otra forma me brindaron su apoyo para hacer de este sueño una realidad.

GRACIAS TOTALES.

Tabla de contenido

Introducción	11
Justificación	13
Objetivos.....	15
General.....	15
Específicos	15
Marco teórico	16
Pruebas diagnósticas	16
Hematología.....	16
Serología.....	17
Inmunofluorescencia	19
ELISA.....	20
Extracción de ADN	21
Técnicas de PCR	22
PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR)	22
PCR convencional o punto final	24
PCR in situ	24
PCR anidada.....	24
PCR múltiplex	26
Materiales y métodos.....	27

Áreas geográficas de estudio	27
Tipo de estudio	27
Tamaño de la muestra.....	27
Muestras.....	28
Tiempo de estudio	28
Hemograma.....	28
Extracción de ADN	28
Detección de <i>Ehrlichia sp</i> y <i>Anaplasma platys</i> por PCR convencional	29
Secuenciación de los productos de PCR	30
Análisis filogenético	30
Prueba serológica (SNAP 4Dx)	31
Resultados.....	32
Discusión	34
Conclusiones	37
Referencias	38
Apéndices	40

Lista de apéndices

Apéndice A. Resultados hematológicos	40
Apéndice B. Integridad del ADN en caninos	43
Apéndice C. Caninos muestreados	44
Apéndice D. Productos de PCR <i>Ehrlichia canis</i>	46
Apéndice E. Árbol filogenético	47
Apéndice F. Productos de PCR <i>Anaplasma platys</i>	48
Apéndice G. Pruebas de SNAP 4DX	49

Resumen

Las enfermedades causadas por bacterias de la familia Anaplasmataceae son consideradas actualmente infecciones bacterianas tropicales comunes en ejemplares caninos en nuestro país. Estos microorganismos pueden cursar de forma similar a otras patologías febriles o asintomáticas, por tal razón muchos casos quedan inconclusos o con diagnóstico erróneo. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en 46 ejemplares caninos para evaluar molecular e inmunodiagnósticamente la presencia de *Ehrlichia* sp y *Anaplasma* sp., en un albergue canino del municipio de Caldas. Se hizo extracción de ADN en muestras de sangre entera con EDTA, capa flogística y coágulo sanguíneo. Se utilizaron cebadores Dsb-330 y Dsb-728 para la detección de segmentos de genes específicos para el género *Ehrlichia*, cebadores groEl (pla-HS475F y pla-HS1198R) para *Anaplasma platys*, y SNAP 4DX como serodiagnóstico. La cuantificación promedio de ADN para los 46 caninos fue de 149.34 ng/μl en capa flogística, 86.72 ng/μl en sangre con EDTA, y 33.68 ng/μl en coágulo sanguíneo. Para los productos amplificados por Dsb se observó una banda de aproximadamente 409 pb en el 28,26% (13/46) de los caninos y para los productos amplificados por groEl se observó una banda aproximadamente de 724pb en el 6,5% (3/46) de los caninos. Las secuencias de todos los productos positivos por Dsb se compararon en el GenBank dando un 100% de identidad con *Ehrlichia canis*; los resultados serológicos fueron del 6,5% (3/46) para *Ehrlichia* sp. Este trabajo permitió demostrar la prevalencia de microorganismos del géneros *Ehrlichia canis* en el municipio de Caldas Antioquia.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, PCR, serología, diagnóstico, secuenciación.

Abstract

Diseases caused by bacteria of the family Anaplasmataceae are now considered common tropical bacterial infections in some species of dogs in Colombia. These microorganisms can behave similarly to other febrile or asymptomatic pathologies. For this reason, many cases are inconclusive or misdiagnosed. Given the above, a descriptive cross-sectional study was conducted on 46 canine specimens in a canine hostel of the municipality of Caldas to evaluate molecularly and immunologically the presence of *Ehrlichia* sp and *Anaplasma* sp., DNA extraction was done in whole blood samples containing EDTA, phlogistic layer and blood clot. Dsb-330 and Dsb-728 primers were used for detection of segments of specific genes for the genus *Ehrlichia*, groEI (pla-HS475F and pla-HS1198R) primers for *Anaplasma platys*, and SNAP 4DX as serodiagnosis. The average quantitation of DNA for the 46 canines was 149.34 ng / ul in buffy coat, 86.72 ng / ul in blood with EDTA, and 33.68 ng / ul in blood clot. For products Dsb amplified by a band of about 409 pb of was observed in 28.26% (13/46) of the canines and for products groEI amplified by a band of about 724 pb of was observed in 6,5% (3/46) of the canines The sequences of all positive Dsb products were compared by GenBank giving a 100% similarity *Ehrlichia canis*; serological results were 6.5% (3/46) for *Ehrlichia* sp. This work has demonstrated the prevalence of microorganisms of the *Ehrlichia canis* kind in Caldas, municipality of Antioquia.

Keywords: *Ehrlichia canis*, PCR, serology, diagnosis, sequencing

Lista de abreviaturas

µl: microlitros

ADN: Acido Desoxirribonucleico

B: Capa flogística

C: Coágulo

CMHB: Concentración Media de Hemoglobina

Dsb: Disulfido oxidoreductasa

Dx: Diagnóstico

HCM: Hemoglobina Corpuscular Media

HG: Hemoglobina

HTO: Hematocrito

ng: nanogramos

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Tiempo real para la Reacción en Cadena de la Polimerasa

SE: Sangre entera con EDTA

sp: Varias especies del mismo genero

VCM: Volumen Corpuscular Medio

Introducción

El género *Ehrlichia* se compone de cinco especies, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminantium*. Todas las especies de *Ehrlichia* infectan hospederos vertebrados y son transmitidas por garrapatas. *E. chaffeensis* y *E. ewingii* son agentes importantes en las enfermedades humanas en América del Norte, mientras que *E. canis*, *E. ruminantium* y *E. ewingii* son patógenos de gran importancia veterinaria, las cuales son transmitidas por vectores como garrapatas y pulgas (Labruna et al., 2007). Las especies actualmente reconocidas en el género *Anaplasma* son *A. phagocytophilum*, *A. platys* (antes *Ehrlichia platys*), *A. marginale* (*A. marginale* subespecie *céntrale*), *A. bovis* (antes *E. bovis*) y *A. ovis*. *Anaplasma phagocytophilum* infecta a los seres humanos y muchas especies de animales. La enfermedad es conocida como anaplasmosis granulocítica humana (HGA; anteriormente ehrlichiosis granulocítica humana), la anaplasmosis granulocítica canina (anteriormente ehrlichiosis granulocítica canina) en perros, la anaplasmosis granulocítica equina (anteriormente ehrlichiosis granulocítica equina) en los caballos. *A. platys* infecta las plaquetas en perros siendo el agente causal de la trombocitopenia cíclica canina, mientras *A. marginale*, *A. bovis* y *A. ovis* infectan a los eritrocitos de rumiantes domésticos y silvestres (de la Fuente et al., 2006).

Ehrlichia es un género de microorganismos de la familia Anaplasmataceae y del orden Rickettsiales, los cuales son transmitidos por vectores (garrapatas y pulgas). Algunos de estos microorganismos intracelulares podrían estar asociados en la transmisión de enfermedades de carácter zoonótico (Botero et al., 2014). Existe un creciente interés en la detección de estos microorganismos debido a sus efectos

adversos sobre la salud humana y en ejemplares caninos domésticos, especialmente en el ciclo de vida de estos patógenos en poblaciones en condiciones de abandono. Colombia, por su ubicación geográfica, diversidad de reservorios, vectores y características climatológicas de predominio tropical reúne todas las condiciones que favorecen la diseminación de vectores (Cartagena, Rios, & Cardona, 2015). Las enfermedades causadas por bacterias del género *Ehrlichia* pueden cursar de forma similar a otras patologías febriles en caninos, por tal razón muchos casos quedan sin ser determinados o con un diagnóstico erróneo.

Justificación

Ehrlichia canis se describió por primera vez en Argelia en 1935, y posterior a esta en otras zonas tropicales y subtropicales del mundo. A partir de la década de 1960 se realizaron estudios debido a una epizootia donde se afectaron perros procedentes de Estados Unidos que eran usados con fines militares en la guerra del Vietnam (Bayón, Talavera, Fernández del Palacio, & Albert, 1999). Debido a la alta morbilidad y mortalidad tomó el nombre de Pancitopenia Tropical Canina, y luego se llamó *Ehrlichia canis* (García & Núñez, 1996). La ehrlichiosis canina es causada por una bacteria gramnegativa intracelular obligada, la cual afecta esencialmente monocitos, aunque una cepa menos patógena ha sido descrita en linfocitos y neutrófilos (Callés, 1988). La observación de inclusiones en los leucocitos y las plaquetas no son útiles para el diagnóstico del agente causal perteneciente a la familia Anaplasmataceae (Dagnone, Souza, André, & Machado, 2009). La bacteria más comúnmente reportada de la familia Anaplasmataceae es *Ehrlichia canis* la cual es transmitida principalmente por ectoparásitos (pulgas y garrapatas), y su vector principal ha sido la garrapata parda del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Quijada et al., 2012).

Colombia, por su ubicación geográfica, diversidad de reservorios, vectores y características climatológicas de predominio tropical reúne todas las condiciones que favorecen la diseminación de vectores. Las enfermedades rickettsiales transmitidas por garrapatas son mantenidas en un ciclo enzoótico y endémico, y anualmente causan brotes afectando a humanos en un ciclo epidémico. La descripción de seropositividad en el país es evidencia indirecta de la circulación de estos microorganismos (Cartagena et al., 2015), sin embargo debido a la baja sensibilidad y especificidad de las pruebas

comerciales, el análisis molecular mediante PCR se convierte en la mejor opción para el diagnóstico preciso de agentes causantes de enfermedad, evitándose reacciones cruzadas con especies o géneros microbianos diferentes que pueden reaccionar positivamente con pruebas serológicas (Martínez, Arraga, Triana, Ruiz, & Gutiérrez, 2015). De esta forma, la vigilancia epidemiológica es la clave de una respuesta oportuna y eficiente; y el pilar fundamental para prevenir las epidemias causadas por estos patógenos emergentes. Las enfermedades transmitidas por vectores no son circunscritas a determinadas regiones, aunque sean característicamente focales, han sido reconocidas en prácticamente cualquier lugar donde hayan sido investigadas.

Las enfermedades causadas por bacterias de la familia Anaplasmataceae son consideradas actualmente infecciones bacterianas tropicales comunes en ejemplares caninos en nuestro país, sin embargo de manera regional no existen registros de detección molecular para reconocer la presencia de enfermedad. *Ehrlichia* sp podría ser uno de los patógenos más comunes en nuestro país, sin embargo es importante el diagnóstico definitivo de la enfermedad ya que estos microorganismos pueden cursar de forma similar a otras patologías febriles en caninos o de manera asintomática, por tal razón muchos casos quedan sin ser determinados o con un diagnóstico erróneo (de la Fuente et al., 2006). Las técnicas utilizadas tradicionalmente en Colombia para su diagnóstico son los frotis sanguíneos o la determinación de la presencia de la enfermedad por sintomatología clínica, lo cual conlleva a múltiples errores clínicos, por lo tanto se hace necesario comparar los resultados serodiagnósticos con las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivos

General

Detectar molecular y serológicamente la presencia de bacterias de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas - Antioquia.

Específicos

- Detectar la presencia de *Ehrlichia* sp en ejemplares caninos de un albergué canino del municipio de Caldas - Antioquia.
- Determinar la Seroprevalencia para *Ehrlichia* sp en ejemplares caninos de un albergue del municipio de Caldas - Antioquia.
- Analizar los resultados hematológicos de los ejemplares caninos de un albergué del municipio de Caldas – Antioquia con detección o seropositivos a *Ehrlichia* sp.
- Detectar la presencia de *Anaplasma platys* en ejemplares caninos de un albergué canino del municipio de Caldas - Antioquia.

Marco teórico

Pruebas diagnósticas

Las pruebas diagnósticas constituyen un elemento fundamental para reducir la incertidumbre; dichas pruebas son útiles, como su nombre lo indica, para el diagnóstico, aunque también lo son para el pronóstico y el tamizaje de enfermedades (Medina, 2011).

Hematología

La hematología (conjuntamente con síntomas específicos a *Ehrlichia* sp) representa una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico de la ehrlichiosis canina, debido a que la bacteria y las alteraciones más importantes de la enfermedad se evidencian a nivel sanguíneo (Hoyos, Li E, Alvarado, Suárez, & Díaz, 2007).

Un hemograma proporciona información en el recuento de glóbulos rojos, blancos y plaquetas. La muestra debe ser sangre entera recogida en tubos con anticoagulante EDTA, se hace un estudio de glóbulos rojos que incluyen la cantidad total de hemoglobina y el hematocrito (proporción de sangre ocupada por glóbulos rojos). También se realiza el estudio de los glóbulos blancos que comprende el recuento total y su recuento diferencial, las proporciones relativas de cada población de leucocitos, aumento o disminución de los distintos tipos celulares ayudando al diagnóstico para diferenciar entre un proceso inflamatorio, parasitario o alérgico. El hemograma incluye un frotis sanguíneo donde se extiende una pequeña gota de sangre sobre una lámina de vidrio (portaobjetos) para formar una película delgada, se deja secar y se tiñe. Los tintes colorean los diferentes tipos de células sanguíneas de manera que se puedan distinguir unas de otras, luego el frotis se examina con un

microscopio, se cuentan los distintos tipos de glóbulos blancos y se examinan las células. Al observar esta extensión de sangre se buscan también posibles parásitos sanguíneos que pudieran aparecer (“Pruebas hematológicas,” n.d.).

En un estudio realizado en Bolivia con 228 ejemplares caninos se pudo correlacionar la asociación entre cambios en el hemograma y la presencia de *Ehrlichia canis*, un 42% de los ejemplares con presencia del microorganismo presentaban trombocitopenia, 5,26% leucopenia (50-1000 leucocitos / μ l), 2,26% (1001-1500 leucocitos / μ l), 13,16% (1501-4999 leucocitos / μ l), 78,95% (>5000 leucocitos / μ l) y para las proteínas plasmáticas totales se encontró una hiperproteinemia 18% e hipoproteinemia 18,4% (Paniagua & Guzmán, 2001). En Rio Grande Sur de Brasil, en el 2012, se realizó una investigación en donde se encontró que en 69 caninos evaluados se obtuvo eosinofilia en el 42% y trombocitopenia en el 44% de los ejemplares muestreados (Hirschmann, 2012). La alteración plaquetaria es un parámetro a tener en cuenta al momento de generar un diagnóstico para *Ehrlichia canis*.

Serología

La serología es una técnica en la cual se aprovecha la habilidad de los organismos para defenderse ante una infección, desarrollando anticuerpos patógeno - específicos y que pueden ser detectados entre 10 y 15 días pos infección, dependiendo del tipo, cantidad, virulencia y patogenicidad del agente causal, vía de infección y capacidad de respuesta inmune del animal infectado. La detección de anticuerpos circulantes no solo depende de factores ligados al individuo o el patógeno investigado, sino también de los métodos empleados para su detección (Höfle & Blanco, 2015).

Recientemente, se han diseñado pruebas serológicas rápidas para la detección de anticuerpos de diversos microorganismos rickettsiales, entre ellos *Ehrlichia canis*, las cuales son de fácil realización y adecuadas para uso clínico (Opazo, Ibañez, Astorga, & Fernandez, 2015).

Para el diagnóstico de *Ehrlichia canis* existen kits comerciales como Elisa SNAP® 3Dx® o 4Dx® la cual presenta una especificidad cercana al 100% y una sensibilidad del 98,9%, y la técnica rápida para *Ehrlichia canis* Ab Inmunocromatográfica (Bionote©, Corea) que presenta resultados similares al Snap (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, Estados Unidos) lo cual garantiza su utilidad diagnóstica y la pertinencia de su utilización en estudios de investigación.

La prueba SNAP es una técnica serológica para la detección de anticuerpos en suero canino, plasma o sangre entera anticoagulada. La positividad de la prueba se da por una reacción colorimétrica, marcando con un punto el sitio donde se encuentra el antígeno del patógeno, si no hay color se considera negativa la muestra evaluada (Quijada et al., 2012).

En un estudio realizado en Venezuela para determinar la frecuencia de infecciones por microorganismos hemotrópicos caninos, se evaluaron 92 muestras de sangre y sueros caninos de ocho centros de atención veterinaria, de cuatro estados durante el año 2012. Se usó el SNAP®3Dx y se determinó un 100% de sensibilidad, luego de comparar animales enfermos con la seropositividad de la prueba (Quijada et al., 2012).

Otro estudio fue realizado en tres ciudades de Colombia para determinar la seroprevalencia por medio del Test IDEXX SNAP® 4Dx®, para *Ehrlichia canis*,

Anaplasma phagocytophilum, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en 498 caninos (Medellín 175, Barranquilla 223 y Cartagena 100). El estudio demostró prevalencia para *Ehrlichia canis* del 26% en Medellín, 83% en Barranquilla y 80% en Cartagena (Mccown, Monterroso, & Cardona, 2015).

Inmunofluorescencia

Esta técnica consiste en la inmunomarcación de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula, es una técnica que tiene variantes cualitativas y cuantitativas. La FPIA (Inmunoensayo de polarización fluorescente), es una prueba de inmunofluorescencia que consiste en una rotación aleatoria de las moléculas en solución, siendo el tamaño molecular el principal factor que influencia la velocidad, con una relación de proporcionalidad inversa. Al añadir el suero problema para detectar la presencia de anticuerpos y agregar un antígeno de baja peso molecular marcado con un fluorocromo, es posible determinar el tiempo de rotación. La unión con el antígeno marcado provoca un descenso en su velocidad rotacional, que puede ser medida ya que una molécula grande emite más luz en un único plano (más polarizada) que una pequeña que gira más deprisa y emite luz menos polarizada (Sánchez, 2010).

En un reporte preliminar para *Ehrlichia canis* en Chile 1999, encontraron títulos de anticuerpos de 1:80 para *Ehrlichia canis*, lo cual confirmó el diagnóstico clínico de Ehrlichiosis canina. No se encontraron anticuerpos contra *Babesia canis*. Un título alto puede ser causado por exposición repetida a la enfermedad, a un gran número de *Ehrlichia* sp. en la sangre o a una mejor respuesta del sistema inmune del perro que responde con mayor producción de anticuerpos. El test puede ser negativo en la

primera fase de la enfermedad, aun habiendo signos clínicos o en los últimos períodos de la fase crónica, cuando el sistema inmune ya no responde, si se encuentran títulos menores a 1:40 se consideran negativos (exposición mínima) y títulos sobre 1:80 se consideran positivos. El tratamiento o la recuperación del paciente no garantizan un FPIA negativo, por lo que no debe considerarse como dador de sangre (López, Castillo, Muñoz, & Hildebrandt, 1999).

ELISA

Esta prueba se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) insolubilizado sobre un soporte inmunoabsorbente, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada facilitando su revelado mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Entre los tipos de ELISA esta la técnica de anticuerpos marcados (ELISA Directo, ELISA Indirecto, ELISA sándwich (Doble (DAS) y Heterólogo (HADAS)), y la técnica de antígeno marcado (ELISA competitivo) (CULTEK Elisa, 2006). En un estudio realizado en Talca-Chile, tomaron 36 muestras caninas a los cuales se les realizó el test de ELISA, Immuno Comb (Biogal Galed Lads) el cual detectó anticuerpos tipo IgG contra *Ehrlichia* sp. considerándose como positivo, los animales que presentase un título $\geq 1:80$ equivalente a S3 dentro del test, dando como resultado una prevalencia del 16,6% (Weinborn, Toro, Leporati, & Castillo, 2012).

En otro estudio para identificar anticuerpos contra *Ehrlichia* sp. en la ciudad de Ibagué, Tolima-Colombia, fue realizada una investigación donde se utilizó el test de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en 398 caninos de clínicas veterinarias de la ciudad y obtuvieron una seroprevalencia del 31,66% (Salazar, Buritica, Echeverry, & Barbosa, 2014).

Extracción de ADN

La extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) constituye la etapa previa de todo análisis genético. Este ADN debe de ser puro y amplificable para obtener buenos resultados al momento de su uso; los pasos para el proceso de extracción de ADN abarca: disrupción celular (ruptura de la bicapa lipídica de las membranas celulares con detergentes, agentes quelantes que secuestran cationes estabilizantes de la membrana, etc.), eliminación de las proteínas que son las principales contaminantes de la extracción, limpieza del ADN por medio de la precipitación con alcoholes, lavado para eliminar restos de reactivos y solventes que puedan inhibir la Taq polimerasa y resuspensión para hidratar el ADN extraído. En las extracciones de sangre se puede utilizar productos con propiedades desnaturalizantes como cloroformo, fenol, etc., y otros que modifican la concentración salina del medio. Estos protocolos requieren estandarización y modificaciones. Entre ellas, la cantidad de muestra (Riera, Rojas, & Zapata, 2010).

Al momento de realizar extracciones de ADN de la sangre, entera con EDTA, capa flogística o/y coágulo, las tres muestras son útiles para el diagnóstico por PCR, debido a que las células sanguíneas son diana de *Ehrlichia canis*; especialmente los monocitos, los cuales se pueden encontrar con mayor concentración en la capa

flogística. Para la extracción de ADN se evalúan varios métodos con el objetivo de determinar la calidad y concentración de la molécula obtenida; un kit usado para este proceso de extracción es el QIAamp ADN Blood Mini (Qiagen®), (Barbosa et al., 2007; Nakaghi et al., 2008). Otro proceso corresponde a una micro-extracción de ADN total por el método Salting out (Rojas et al., 2013). El ADN total extraído se almacena en congelador de -20°C y para su visualización, se separa en un gel de agarosa (0,8% p/v, gel de 15 cm de ancho por 10 cm de largo), adicionado con bromuro de etidio (1,0 mg/ml), y buffer TBE (Trizma Base, Ácido Bórico, EDTA), a una concentración final de 0,5X; incluyendo en la electroforesis un marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline®); la electroforesis se realiza a 80 voltios por 1 h y las bandas se visualizan en un transiluminador ultravioleta (Eagle Eye II Strategene®) (Rojas et al., 2013).

Técnicas de PCR

PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR)

Su principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión también denominado valor T_m, del inglés melting temperature. Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en las técnicas basadas en sondas específicas (Martinez & Silva, 2004).

En las técnicas basadas en fluorocromos el ADN, se ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, intercalándose en el ADN el fluorocromo y produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador. También permite cuantificar sólo una secuencia

por reacción pero tiene la ventaja de ser más económica que la que utiliza sondas específicas (Martinez & Silva, 2004). Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*); cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (Martinez & Silva, 2004).

En un estudio epidemiológico-molecular realizado en dos estados brasileños (Rondonia y Sao Paulo) 2006, para determinar que especies de *Ehrlichia* son responsables de ehrlichiosis en humanos y animales de Norte América se podían encontrar como vectores en Brasil, las muestras que incluyeron 376 garrapatas comprendieron (9 especies de *Amblyomma* sp, 29 de bazos de chigüiros (*Hydrochaeris hydrochaeris*), 5 muestras de sangre canina, y 75 muestras de sangre humana de pacientes febriles con antecedentes de picaduras de garrapatas), las cuales fueron analizadas por qPCR para amplificar un fragmento del gen *Dsb* para *Ehrlichia*, en donde se encontró que el ADN de *Ehrlichia* no se detectó en las garrapatas, chigüiros o muestras humanas, sin embargo hubo detección de segmentos de ADN para *Ehrlichia* en cuatro de las cinco muestras de sangre canina después de la secuencia (355-pb sin cebadores) de los productos de qPCR se encontró un porcentaje de identidad del 100% con la *Ehrlichia canis* identificada con el número de GenBank AF403710. Por el contrario, se detecto ADN de *Ehrlichia* en muestras brasileñas de capibaras, humanos, y garrapatas con el ensayo de PCR en tiempo real (Labruna et al., 2007).

PCR convencional o punto final

Esta prueba permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN; para esto es requisito fundamental disponer de fragmentos cortos de ADN (primers o cebadores) de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán para que la enzima Taq polimerasa pueda incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completado el ciclo del termociclador, se podrá visualizar mediante electroforesis en gel de agarosa (Pérez de Castro, 2005).

Ha sido determinado que en PCR convencional o punto final se pueden amplificar segmentos de genes con un límite de detección de 20 pg; para *Ehrlichia* sp ha sido empleada la PCR basada en la amplificación del gen Dsb (gen de la proteína de formación de puentes disulfuro) (Dolz et al., 2013).

PCR in situ

Consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Es realizada sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. En la técnica de PCR *in situ* se realiza una primera amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas de ADN/ARN. De esta manera se pueden detectar concentraciones muy bajas del gen blanco (Martinez & Silva, 2004).

PCR anidada

Es una técnica muy sensible donde el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican

dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La especificidad aumenta porque como es amplificación de un amplicón obtenido previamente, los cebadores sólo van a hibridar en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda. Así se busca evitar posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores. La desventaja de esta técnica es que no permite cuantificar la muestra (Martínez, Arraga, Triana, Ruiz & Gutiérrez, 2015).

En un estudio realizado en el estado de Aragua, Venezuela en el 2015 en garrapatas de 110 caninos para evaluar de forma molecular la presencia de *Ehrlichia canis*, se obtuvo por PCR con cebadores ECC/ECB resultados positivos del 51,6% (16/31) y para PCR anidada con cebadores HE3/ECA resultados positivos del 45,2% (14/31) (Martínez et al., 2015). En otro estudio para la evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante técnica molecular (PCR) en 330 perros de Costa Rica fueron analizadas 300 muestras de sangre, se detectó ADN de *Ehrlichia canis* en 147 (49,0%) (Romero et al., 2010). En el estudio realizado para la detección molecular de *Ehrlichia canis* en perros de Malasia, fueron tomadas 500 muestras de sangre (323 casos clínicos y 177 perros callejeros) y fueron evaluados por medio de PCR multiplex, de los cuales 10 fueron positivos a *Ehrlichia canis*, con una prevalencia global del 2% (Martínez et al., 2015). En otro estudio realizado en Brasil 2009 para comparar *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* por PCR anidada (nPCR) en muestras de sangre entera con EDTA de 100 perros, se realizó frotis de las muestras de sangre para buscar parásitos intracelulares y compararlos con nPCR, obteniendo resultados positivos del 9% para *Ehrlichia canis* y 21% para *Anaplasma platys* cuando la evaluación se hizo por frotis de

sangre y del 57% y 55% cuando se hizo por la técnica nPCR, respectivamente; los resultados indicaron que nPCR es altamente sensible y específico para la detección de ambos patógenos (Martínez et al., 2015).

PCR múltiplex

Consiste en la amplificación simultáneamente más de una secuencia. Para ello se combinan dos o más pares de cebadores en un mismo tubo, para amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN. Ventajas: información sobre varios locus en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de bases de datos. Las desventajas que esta técnica podría presentar es que requiere una cuidadosa optimización del proceso (Martinez & Silva, 2004).

Materiales y métodos

Áreas geográficas de estudio

Las muestras provienen de ejemplares caninos que residen en el albergue canino Hogar de Alicia, vereda La Miel, kilometro 3, Municipio de Caldas, Departamento de Antioquia, a una altitud promedio de 1.750 msnm, y temperatura promedio de 19 C°.

Tipo de estudio

Estudio de prevalencia de tipo transversal.

Tamaño de la muestra

Se usó la fórmula para tamaño muestral en poblaciones finitas como se muestra en la ecuación 1 (Dohoo, 2012).

$$n = \frac{N * Z_a^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_a^2 * p * q}$$

Donde:

Z_a: 1.96 al cuadrado (Nivel de confianza por encima del 95%) (1)

p: proporción esperada: 30%

q: 1 - p (1 - 0,30) = 0,7%

d: precisión: 10%

N: total estimado de la población canina (110 perros)

El tamaño de la muestra fue de 46 ejemplares caninos, dichas muestras fueron obtenidas de forma aleatoria, tomando los caninos hasta completar el número predispuesto.

Muestras

Las muestras fueron recolectadas en el albergue canino Hogar de Alicia en tubo tapa roja y se centrifugaron a 2000 rpm/10 minutos para la separación de suero y coágulo, y tubo tapa lila con EDTA para la separación de sangre entera y luego esta se centrifugó a 1500 rpm/10 minutos para separar la capa flogística (Albéitar., 2016). Posteriormente fueron analizadas en el Laboratorio de Diagnóstico y Estudios Clínicos de la Corporación Universitaria Lasallista, y se almacenaron a una temperatura de -20 C° hasta el momento de su análisis.

Tiempo de estudio

El trabajo de campo, toma y procesamiento de muestras, detección serológica y molecular fueron realizados entre Marzo del 2015 y Marzo del 2016.

Hemograma

Para la realización del hemograma en los ejemplares caninos se tomaron 5 ml de sangre entera con EDTA obtenida de la vena cefálica, posterior a esto fueron transportadas bajo condiciones de refrigeración y llevadas hasta el Laboratorio de Diagnóstico y Estudios Clínicos de la Corporación Universitaria Lasallista donde se realizó el análisis hematológico en un equipo normalizado (Abacus Junior Vet, Diatron®).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de coágulo, sangre con EDTA y capa flogística se utilizó un kit de la marca ThermoScientific tissue ADN purification®, y fueron procesadas según las recomendaciones del fabricante.

A los productos extraídos se les hizo electroforesis para verificar la integridad del ADN, adicionalmente fue cuantificado y medida su pureza por medio de espectrofotometría, posterior a esto se almacenó en refrigeración a 4°C por 12 horas y luego se llevó a congelación a -20°C hasta su uso en PCR convencional.

Detección de *Ehrlichia sp* y *Anaplasma platys* por PCR convencional

Se utilizaron iniciadores Dsb-330 (5' GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT 3') y Dsb-728 (5'CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT 3'), GenBank CP000107 (Labruna et al., 2007), los cuales amplifican un fragmento de 409-pb para el género *Ehrlichia sp*. Se usó el kit de PCR Phusion Green Hot Start II High-Fidelity ADN Polymerase (Thermo®) y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se estandarizaron los métodos de laboratorio para preparar un volumen por reacción de 20µl, obteniendo la siguiente concentración que contenía el volumen final: buffer 1x, 200µM de cada uno de los dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los iniciadores, 3% de DMSO, 0.02 U/µl de Taq polimerasa y 2 µl del ADN, para cada ensayo se montó un control positivo y dos control negativos (uno interno, donde se prepara el mix y otro externo, donde se montan las muestras de ADN). Las condiciones en el termociclador fueron de 98°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 98°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, una extensión final de 72°C por 5 minutos y 4°C hasta el momento de desmontar las reacciones. Todos los productos fueron corridos en gel de agarosa al 2%, usando como intercalante EZ-Visión. La fuente de poder de la cámara de electroforesis se programo a 100 voltios por 40 minutos y se realizaron los revelados en un Fotodocumentador Gel Doc™ XR+System BioRad. El tamaño de las

bandas se calculó por comparación con un marcador de 100 pb de ADN (Zilinskiene, 2000).

Para *Anaplasma platys* se utilizaron iniciadores pla-HS475F (5' AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA 3') y pla-HS1198R (5' CATAGTCTGAAGTGGAGGAC 3'), GenBank KR011926.1 los cuales amplifican un fragmento de 724-pb del gen groEl para la especie bacteriana *Anaplasma platys*, se utilizó el mismo kit usado para Dsb *Ehrlichia* sp., con el mismo protocolo en la preparación del MIX para la PCR convencional, y el termociclado fue 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos y 4°C hasta el momento de desmontar las reacciones (Inokuma et al., 2007 y Cicuttin et al., 2015).

Secuenciación de los productos de PCR

Todos los productos con resultado positivo a *Ehrlichia* spp y *Anaplasma platys* fueron enviados a secuenciar en la empresa MacroGen Inc., Seoul-Korea.

Análisis filogenético

Se usó el programa BLAST para comparar las secuencias obtenidas con el GenBank. Las secuencias fueron alineadas en el programa MEGA 6.1 (Tamura, et al 2011), al identificar que las muestras eran idénticas se tomó una secuencia consenso, la cual fue analizada filogenéticamente con secuencias de referencias de cada una de las especies de *Ehrlichia*, tomadas de la base de datos GenBank®. Los resultados de

identidad y cobertura fueron analizados con el fin de establecer homologías con secuencias de referencia (NCBI, 2016).

Los resultados de identidad y cobertura fueron analizados con el fin de establecer homologías con secuencias de referencia. Se realizó un árbol filogenético por el método Neighbor-Joining con el gen *Dsb* (290 nucleótidos) de *Ehrlichia*. Se uso un bootstrap de 1000 replicas y el método de la distancia de P para el cálculo de la distancia evolutiva. El análisis fue realizado en el programa MEGA 6.1 y el árbol fue enraizado en el punto medio.

Prueba serológica (SNAP 4Dx)

Para las pruebas serológicas se utilizo el kit de SNAP 4Dx del laboratorio IDEXX® para la detección de Antígeno de *Dirofilaria immitis* (gusano del corazón canino), Anticuerpos frente a *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* (Antigen-anaplasma et al., 2013).

La muestra de suero previamente separado por centrifugación a 4000 rpm/10 minutos y refrigerado a -20°C, se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos, pasado este tiempo se procedió a la realización de las pruebas según indicaciones del fabricante (Antigen-anaplasma et al., 2013).

Resultados

En el análisis hematológico no se evidenciaron anomalías en ninguno de los ejemplares caninos (apéndice A); los análisis hematológicos del cuadro de glóbulos rojos, blancos y plaquetas se compararon con los valores de referencia de perros sanos de 97 perros sanos entre 1 y 6 años de edad atendidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de Antioquia entre 2002 y 2009 (Bossa, Valencia, Carvajal, & Ríos, 2012).

Se observó por medio de la electroforesis que todo el ADN extraído, presentaba una buena integridad de las moléculas y arrojaron en promedio una cuantificación por espectrofotometría de 149.34 ng/μl en las muestras de capa flogística, 86.72 ng/μl en la sangre entera con EDTA, y 33.68 ng/μl en el coágulo sanguíneo (Apéndice B). Para la capa flogística la relación 260-280 en promedio fue de 1.85, sangre entera con EDTA 1.75, y coágulo sanguíneo 1,82 (Apéndice C).

Para los productos de amplificación de fragmentos del gen *Dsb* (Labruna et al., 2007), se observó una positividad del 28,26%, 13 de las 46 muestras analizadas (Apéndice E). Y para el gen *Anaplasma platys* *groEl* se observó una positividad del 6,5%, 3 de las 46 muestras analizadas (Apéndice F).

Los resultados positivos obtenidos para *Ehrlichia* sp y *Anaplasma* sp por SNAP 4DX fueron de un 6,5% (3/46) para ambas bacterias, lo que indica que el 93,5% de los caninos evaluados no tenían anticuerpos para unirse al antígeno de la prueba (Apéndice G).

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados y comparados con las secuencias del GenBank dando un 100% de identidad con *Ehrlichia canis* en los productos de la PCR con iniciadores de Dsb y un 100% con *A. platys* de los productos de la PCR con iniciadores groEI. Adicionalmente se hizo un análisis filogenético usando una secuencia consenso de los productos de la PCR con los iniciadores Dsb, confirmando la identidad de estas secuencias con *Ehrlichia canis* (Apéndice E).

Discusión

El estatus de las infecciones causadas por *Ehrlichia* sp. en ejemplares caninos de albergues en el Valle de Aburra no se conocía hasta este estudio.

De acuerdo a los resultados moleculares obtenidos con este estudio, se observó que la alta prevalencia de *Ehrlichia canis* puede deberse a condiciones sanitarias deficientes en las cuales se encuentran estos animales, los cuales son rescatados o abandonados en las zonas periurbanas o rurales; los resultados son levemente inferiores a otros estudios realizados en Colombia en los departamentos de Cundinamarca, Meta y Santander (Vargas-Hernández et al. 2012) quienes registraron prevalencias del 40,6% de *Ehrlichia canis* diagnosticada por métodos moleculares. El presente estudio determina la circulación en sangre de bacterias de la familia Anaplasmataceae demostrando la importancia epidemiológica de los ejemplares caninos del Valle de Aburra, en la trasmisión de estos agentes.

La seroprevalencia de *Ehrlichia canis* por SNAP 4Dx fue del 6,5%; este resultado es diferente al obtenido en Ibagué-Colombia donde hallaron resultados del 31,66% (Salazar et al., 2014). Iguales resultados se dieron en Medellín, Barranquilla y Cartagena donde se evidencio una seroprevalencia del 31,66% superior a la obtenida en el Hogar de Alicia (Caldas-Antioquia) (Salazar et al., 2014). La seroprevalencia no concuerda con los resultados obtenidos en la detección molecular *E. canis*, debido a que solamente uno de los 13 ejemplares con detección molecular presentaba anticuerpos contra la bacteria, esto pudo haberse debido a que los 12 animales

restantes se encontraban en una fase inicial de la infección y por lo tanto aún no habían desarrollado anticuerpos detectables por esta prueba.

En este estudio se encontró que la *Ehrlichia canis* en los ejemplares caninos del Hogar de Alicia fue del 28,26% por PCR convencional con cebador Dsb, este resultado es similar al estudio realizado en Costa Rica con resultados del 36% de positividad (Dolz et al., 2013); sin embargo difiere con los resultados obtenidos por PCR en tiempo real en Brasil donde hallaron una prevalencia entre el 74,6 al 91,8% de positividad para *Ehrlichia canis* (Labruna et al., 2007). En el presente estudio se evidenció una detección molecular diferente en la mayoría de los tres tipos de muestras (sangre con EDTA, capa flogística y coágulo) en donde solo uno de los ejemplares se evidenció ADN de *Ehrlichia canis*, lo que permite inferir la necesidad de utilizar adicionalmente otros primers para mejorar la sensibilidad en el PCR.

Para *Anaplasma platys* se encontró una prevalencia del 6,5% por técnica molecular, con resultados similares a los reportados en Costa Rica del 6,33% (Romero et al., 2010). En este estudio se evidencia que los resultados serológicos de los ejemplares caninos con detección a esta bacteria no presentaron una reacción cruzada con los ejemplares positivos a *Ehrlichia canis*. Es importante recalcar que dos de los tres ejemplares con serodiagnóstico positivo a *Anaplasma* sp les fue detectado por técnicas moleculares ADN de *Anaplasma platys* lo que confirma la sensibilidad y especificidad con las dos técnicas para este microorganismo.

Finalmente al analizar los resultados hematológicos, se determina que tanto la línea celular blanca como las plaquetas (células blanco de infección e indicadores de

ehrlichiosis canina) no evidencian valores anormales en ejemplares con presencia molecular a *Ehrlichia canis*. Los ejemplares caninos, en el momento del estudio reflejaron un buen estado de salud, esto sugiere que a pesar de la presencia de bacterias de la familia Anaplasmataceae, es posible que las cargas bacterianas no fueran las suficientes para ocasionar tanto anomalías hematológicas como sintomatología clínica propia, como la presencia de anemia, leucopenia o trombocitopenia. También se evidencia que las técnicas moleculares empleadas en este estudio son sensibles y específicas para detectar bajas cantidades de ADN circulante de *Ehrlichia sp* y *Anaplasma platys* en los ejemplares caninos, por lo que las convierte útiles para ser usadas en diagnóstico subclínico de Ehrlichiosis canina.

Conclusiones

Por medio de PCR-convencional se determinó la presencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en el albergue canino Hogar de Alicia. Este trabajo permitió demostrar la presencia y seroprevalencia de microorganismos del géneros *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en el municipio de Caldas Antioquia. La capa flogística (línea blanca) es la muestra que genero una mayor concentración de ADN en la cuantificación y en el número de muestras con detección molecular a *Ehrlichia* sp, sin embargo la manipulación de las muestras de sangre, y al no ser estadísticamente significativo en comparación con muestras de sangre con EDTA, no se considera conveniente para futuros estudios el uso de este tipo de células blanco. *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* presentan una prevalencia similar en general a estudios serodiagnósticos y moleculares en ejemplares caninos en el país. Las técnicas con amplificación en segmentos de los genes DSB y GroEl son específicas y sensibles para el diagnóstico temprano de la enfermedad canina. Los valores hematológicos pueden no estar alterados en presencia de microorganismos de la familia Anaplasmataceae. La detección en la circulación de estos dos géneros de microorganismos es importante para establecer medidas de control de vectores de manera regional con el fin de reconocer posibles factores asociados a la presencia de enfermedad.

Referencias

- Albéitar., L. (2016). TOMA Y ENVIO DE UNA MUESTRA PARA REALIZAR ESTUDIO HEMATOLOGIA. Retrieved from <http://www.albeitar.com/content.php?section=3&element=14>
- Antigen-anaplasma, Heartworm, C., Antibody, Canis-ewingii, E., Kit, Test, ... Española, V. (2013). Version française Precauciones y advertencias Informationen zur Probe IDEXX SNAPshot Dx * Analyzer Analizador IDEXX SNAPshot Dx * Precauções e advertências Precauzioni e avvertenze Procedura del test Interpretação dos resultados Analizador IDEXX SNAPshot.
- Bayón, A., Talavera, J., Fernández del Palacio, M., & Albert, A. (1999). Manifestaciones oculares en un perro con Ehrlichiosis. *AN. VET. (MURCIA)*, 15, 75–84.
- Bossa, M., Valencia, C., Carvajal, B., & Ríos, L. (2012). Automated hemogram values for healthy dogs aged 1 to 6 years attended at the Veterinary Hospital-Universidad de Antioquia (Colombia), 2002-2009. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 409–416.
- Callés, A. (1988). Ehrlichiosis canina. *Avepa*, 8(3), 141–148.
- Cartagena, L., Rios, L., & Cardona, J. (2015). Seroprevalencia de Ehrlichia canis en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, (29), 2012–2014.
- CULTEK Elisa, S. (2006). Fundamentos y Tipos de ELISAs., 1–7.
- Dagnone, A., Souza, A., André, M., & Machado, R. (2009). Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 18(4), 20–25. <http://doi.org/10.4322/rbpv.01804004>
- de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Silviane, N., Alongi, A., La Mantia, F., & Kocan, K. (2006). Molecular characterization of Anaplasma platys strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet. Res*, 2, 24–28.
- Dohoo, R. M. S. W. (2012). *Methods in epidemiologic research*.
- Dolz, G., Ábrego, L., Romero, L., Campos, L., Bouza, L., & Jiménez, A. (2013). Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 55(Supplement 1), 34–40. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022013000400008&nrm=iso
- Garcia, C., & Núñez, L. (1996). pancitopenia tropical en un perro, 7.
- Hirschmann, L. C. (2012). Padrões hematológicos de cães errantes provenientes de seis municípios do rio grande do sul.
- Höfle, U., & Blanco, J. (2015). La Serología como instrumento Diagnóstico En Fauna Salvaje, 1–12.
- Hoyos, L., Li E, O., Alvarado, A., Suárez, F., & Díaz, D. (2007). Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú (RIVEP)*, 18(2), 129–135. Retrieved from http://go.galegroup.com/ps/i.do?id=GALE|A272169101&v=2.1&u=unl_cons&it=r&p=IFME&sw=w&asid=58882ee573b3a66adf8a11d630e40abb
- Labruna, M., McBride, J., Camargo, L., Aguiar, D., Yabsley, M., Davidson, W., ...

- Walker, D. H. (2007). A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 143(2), 189–195. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.005>
- López, J., Castillo, A., Muñoz, M., & Hildebrandt, S. (1999). Hallazgo de Ehrlichia canis en Chile, informe preliminar Ehrlichia canis in Chile; preliminary report. *Arch. Med. Vet.*, 31(2). Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Martinez, A., & Silva, E. (2004). Metodos fisico quimicas en biotecnologia. *Analytical Chemistry*, 62(13), 1202–1214. <http://doi.org/10.1021/ac00212a004>
- Martínez, M., Arraga, C., Triana, F., Ruiz, J., & Gutiérrez, C. (2015). Estudio Serológico y Molecular de Ehrlichia canis en Perros de una Comunidad del Estado Aragua , Venezuela. *Rev Inv Vet Perú*, 26(4), 648–656.
- Mccown, M., Monterroso, V., & Cardona, W. (2015). Monitoreo de Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, and Dirofilaria immitis in Dogs From Three Cities in Colombia. *Revista CES*, 10, 224–231.
- Medina, M. (2011). Metodología, 40(4), 787–797.
- NCBI. (2016). GenBank. Retrieved March 23, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Opazo, A., Ibañez, V., Astorga, G., & Fernandez, I. (2015). Determinación de microfilarias mediante el test de Knott modificado y la seroprevalencia de Ehrlichia Spp. y Borrelia Burdorgferi mediante el Snap 4dx® en muestras de sangre de perros de dos regiones en Chile., (2), 4–5.
- Paniagua, M., & Guzmán, C. (2001). Ehrlichiosis, Histopatológicas D E Hospital, Canina Paniagua, M L R Guzmán, C J Veterinarias, Facultad De Ciencias, 1–113.
- Pérez de Castro, A. (2005). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction , PCR). *Universidad Politécnica de Valencia*, 1–10.
- Pruebas hematológicas. (n.d.).
- Quijada, J., García, M., Sánchez, G., Bethencourt, A., Medina, O., Isis, V., ... García, H. (2012). Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de venezuela. *Revista Electronica de Veterinaria*, 13(8), 1–16.
- Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia Y Tecnología*, 14, 12–15.
- Rojas, A., Rueda, A., Díaz, D., Mesa, N., Benavides, J., Imbachi, K., ... López, R. (2013). Identificación de Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinaria Y Zootecnia*, 7(1), 37–48. Retrieved from <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v7n1a03.pdf>
- Romero, L., Wiedner, G., Romero, J., Meneses, A., Jiménez, M., & Salazar, L. (2010). sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica smears and molecular technique, 28, 23–36.
- Salazar, H., Buritica, E., Echeverry, D., & 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.
- Sánchez, J. (2010). Metodologías analíticas para la determinación de metales tóxicos

en muestras de interés ambiental.

Weinborn, R., Toro, I., Loporati, M., & Castillo, D. (2012). Hallazgos serológicos de Ehrlichia spp. en caninos de la ciudad de Talca, Chile., 4, 2–5.

Zilinskiene, J. (2000). Thermo Scientific Protocol for Loading, 1–2.

Apéndices

Apéndice A.Resultados hematológicos

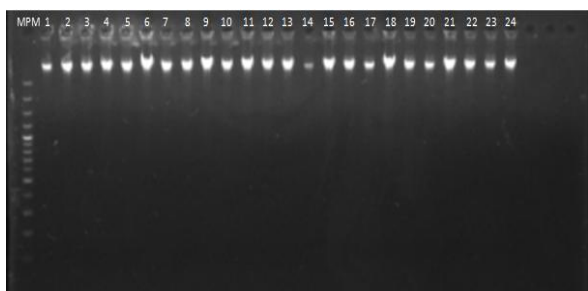
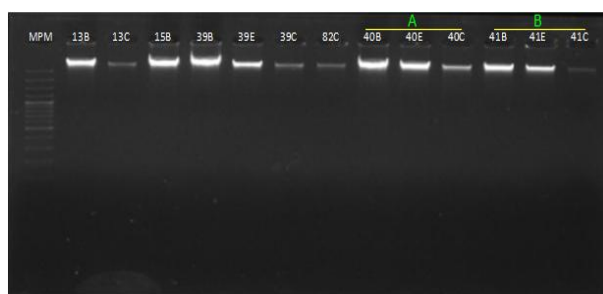
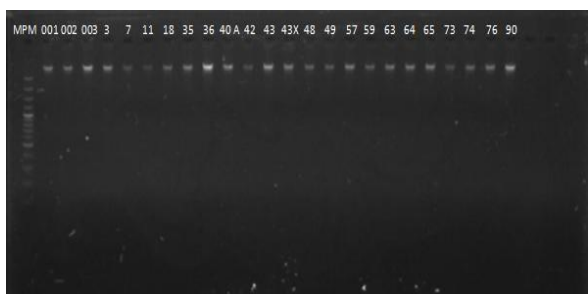
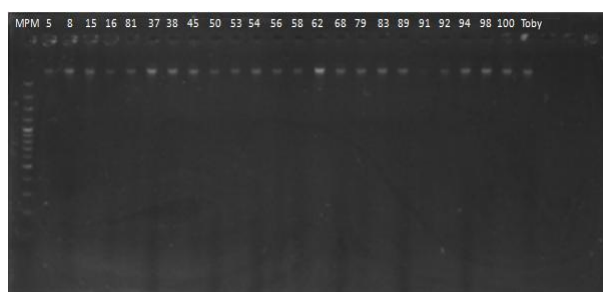
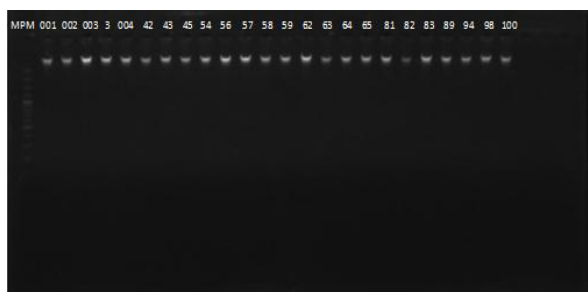
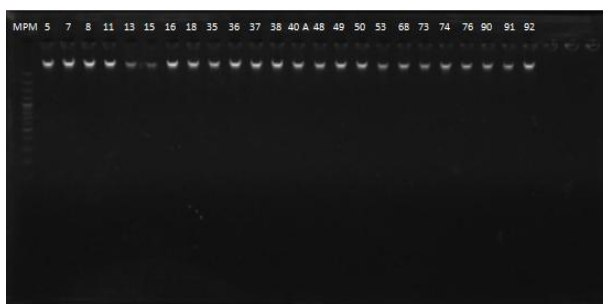
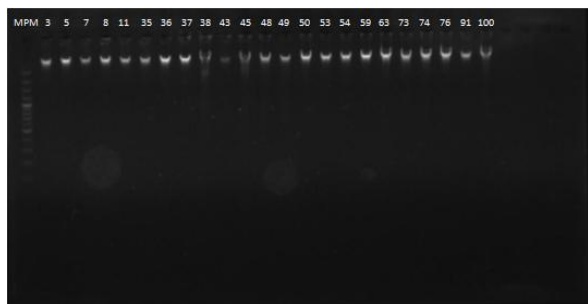
Muestra	RESULTADOS HEMATOLÓGICOS									
	ERITROCITOS	HTO	HG	VCM	HCM	CMHB	LEUCOCITOS	NEUTROFILOS	NEUTROFILO%	LINFOCITOS
3	7.940.000	52,8	18	67	22,6	34	16.400	10,52	64	4,6
5	7.600.000	47,1	16,3	62	21,4	34,6	13.200	8,85	67	3,57
7	8.820.000	52,6	17	60	19,3	32,3	15.420	7,71	50	5,39
8	9.240.000	60,6	20	66	21,6	32,9	13.740	8,38	61	4,53
11	8.050.000	50,4	17,2	63	21,4	34,1	11.930	7,75	65	3,81
13	9.660.000	59,3	19,7	61	20,4	33,2	12.060	8,56	71	2,77
15	8.510.000	53,9	18,6	63	21,9	34,5	14.560	8,15	56	5,38
16	7.460.000	45,8	15,3	61	20,5	33,3	12.800	8,19	64	3,71
18	9.200.000	58,1	19,8	63	21,5	34	13.780	7,3	53	4,41
35	6.360.000	39,1	13,4	61	21	34,2	14.830	8,01	54	5,04
36	6.510.000	40,4	13,5	62	20,7	33,3	20.300	11,57	57	7,1
37	6.460.000	41,4	14	64	21,7	33,8	14.900	7,15	48	6,41
38	6.400.000	39,6	13,5	62	21,2	34,2	17.010	9,18	54	6,46
39	5.543.000	30,1	12,3	59	20,1	33,4	10.000	6,000	60	2,5
40	6.740.000	42,5	14,1	63	20,9	33,1	14.960	6,88	46	6,88
42	6.580.000	41,7	13,8	63	21	33,2	17.380	11,12	64	5,56
43	7.990.000	49,9	16,7	62	20,9	33,5	12.410	8,56	69	3,35
45	7.810.000	46	15,7	59	20,1	34,2	13.370	6,95	52	4,54
48	8.310.000	54,3	18,4	65	22	33,7	17.910	9,13	51	5,73
49	9.770.000	58,1	19,4	60	19,8	33,56	14.250	10,4	73	2,49
50	6.070.000	36,9	10,8	61	17,8	29,3	7.510	4,81	64	2,33
53	8.060.000	53,7	18	67	22,3	33,5	17.960	9,52	53	6,82
54	6.510.000	40,4	13,5	62	20,7	33,3	20.300	11,57	57	7,1
56	7.790.000	49,8	16,8	64	21,6	33,7	12.120	8,24	68	3,27
57	8.310.000	54,3	18,3	65	22	33,7	17.910	9,13	51	5,73
58	8.770.000	51,8	18,1	59	20,6	34,9	14.740	8,99	61	5,01
59	7.760.000	50,1	17,2	65	22,5	34,3	9.180	6,15	67	2,75
62	6.930.000	43,6	14,9	63	21,5	34,4	9.110	5,37	59	2,82

63	7.900.000	49	16,9	62	21	33,8	27.700	18,72	79	3,08
64	7.680.000	51,3	16,9	67	22	32,9	12.900	7,75	60	4,26
65	6.570.000	39,4	13,4	60	20,4	33,9	11.060	5,64	51	3,64
68	7.380.000	48,6	16,5	66	22,4	33,9	13.070	7,58	58	4,44
73	7.490.000	48,1	16,5	64	22,1	34,4	13.530	9,87	73	2,84
74	7.130.000	47,5	15,5	67	21,7	32,5	9.060	5,61	62	2,89
76	7.410.000	48,2	16,3	65	22	33,7	22.130	13,94	63	7,96
79	7.570.000	50	16,7	66	22,1	33,4	12.840	8,98	70	3,33
81	7.490.000	49,2	16,7	66	22,3	33,8	16.040	8,34	52	7,05
82	7.810.000	48,4	16,5	62	21,1	33,9	12.980	8,04	62	4,54
83	6.850.000	44,4	14,6	65	21,3	32,9	5.560	3,28	59	2,16
89	6.100.000	38,2	13	63	21,3	34,1	18.120	12,1	67	4,53
90	8.830.000	56	18,9	64	21,4	33,7	14.750	9,88	67	4,42
91	8.150.000	56,9	19	70	23,4	33,4	15.760	10,4	66	4,41
92	8.160.000	52,4	18,7	68	22,9	33,7	10.490	5,55	53	4,72
94	7.280.000	44,4	15,5	61	21,3	35	16.270	10	62	5,02
98	7.490.000	45,2	15,1	60	20,1	33,3	15.670	9,4	60	5,79
100	6.730.000	43,3	14,7	64	21,9	34	16.270	9,11	56	6,5

Muestra	RESULTADOS HEMATOLÓGICOS						
	LINFOCITOS%	EOSINOFILOS	EOSINOFILOS%	BANDAS	MONOCITOS	MONOCITOS%	PLAQUETAS
3	28	1,31	8	0	0	0	448.000
5	27	0,79	6	0	0	0	352.000
7	35	2,16	14	0	0	0	190.000
8	33	0,82	6	0	0	0	411.000
11	32	0,24	2	0	0,12	1	468.000
13	23	0,72	6	0	0	0	420.000
15	37	0,87	6	0	0,14	1	340.000
16	29	0,89	7	0		0	281.000
18	32	1,79	13	0	0,28	2	258.000
35	34	1,63	11	0	0,15	1	406.000
36	35	1,22	6	0	0,4	2	385.000
37	43	1,34	9	0	0	0	409.000
38	38	1,19	7	0	0,17	1	503.000
39	25	1,5	15	0	0	0	200.000
40	46	1,2	8	0	0	0	502.000
42	32	0,69	4	0	0	0	493.000
43	27	0,49	4	0	0	0	280.000
45	34	1,87	14	0	0	0	312.000

48	32	3,04	17	0	0	0	373.000
49	21	0,86	6	0	0	0	221.000
50	31	0,38	5	0	0	0	180.000
53	38	1,44	8	0	0,18	1	328.000
54	35	1,22	6	0	0,4	2	385.000
56	27	0,6	5	0	0	0	375.000
57	32	3,04	17	0	0	0	373.000
58	34	0,74	5	0	0	0	278.000
59	30	0,27	3	0	0	0	314.000
62	31	0,82	9	0	0,09	1	210.000
63	13	1,65	7	0	0,23	1	244.000
64	33	0,9	7	0	0	0	415.000
65	33	1,76	16	0	0	0	378.000
68	34	1,04	8	0	0	0	232.000
73	21	0,81	6	0	0	0	234.000
74	32	0,54	6	0	0	0	273.000
76	36	0,27	1	0	0	0	228.000
79	26	0,51	4	0	0	0	283.000
81	44	0,48	3	0	0,16	1	244.000
82	35	0,25	2	0	0,12	1	214.000
83	39	0,05	1	0	0,05	1	500.000
89	25	1,47	8	0	0	0	259.000
90	30	0,44	3	0	0	0	241.000
91	28	0,78	5	0	0,15	1	224.000
92	45	0,2	2	0	0	0	210.000
94	31	1,13	7	0	0	0	271.000
98	37	0,47	3	0	0	0	323.000
100	40	0,65	4	0	0	0	214.000

Apéndice B. Integridad del ADN en caninos



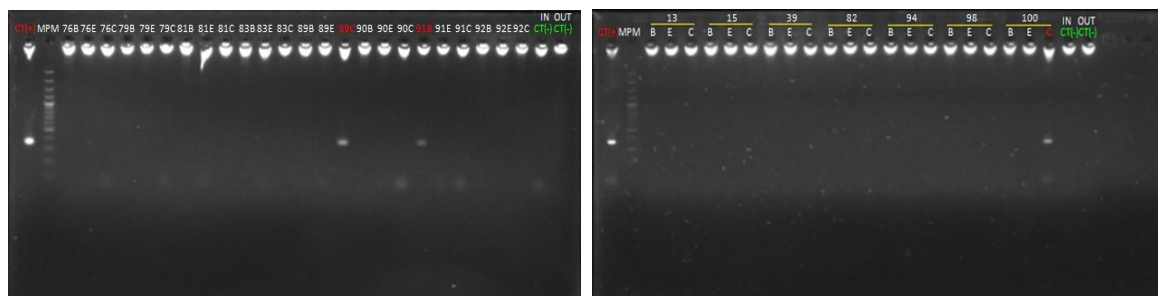
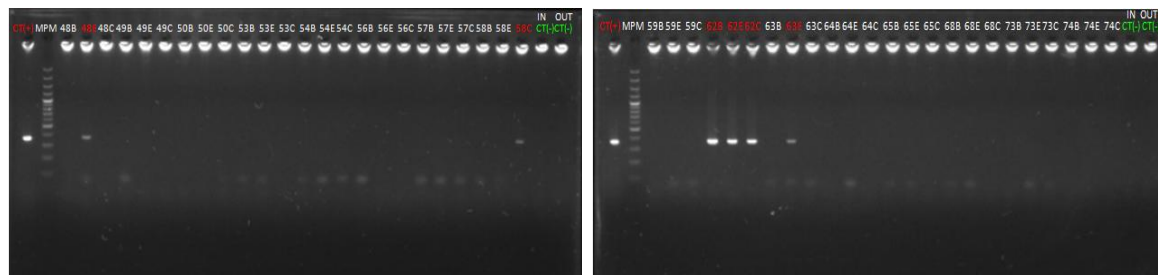
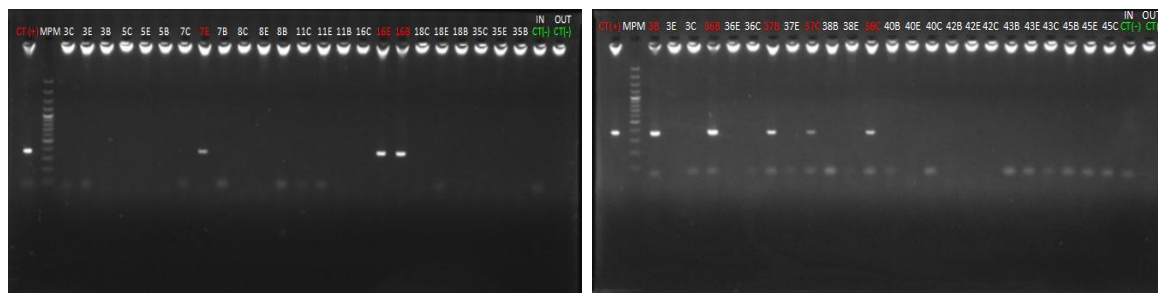
Apéndice C. Caninos muestreados

N° muestra	CONCENTRACION ADN (ng/ μ l)			RELACION Abs 260-280			Resultados PCR - Dsb		
	B	SE	C	B	SE	C	Positivo		
	B	SE	C	B	SE	C	B	SE	C
3	100,68	134,41	13,82	1,89	1,48	1,85	1	0	0
5	68,62	108,92	10,19	1,89	1,64	1,6	0	0	0
7	67,79	119,75	6,51	1,85	1,86	2,11	0	1	0
8	87,84	102,45	55	1,84	1,89	1,02	0	0	0
11	54,26	82,25	3,72	2,05	1,89	1,9	0	0	0
13	161,12	23,77	97,25	1,64	2,5	1,14	0	0	0
15	296,51	20,19	25,39	1,88	1,93	1,37	0	0	0
16	128,77	81,22	5,19	1,96	1,87	1,65	1	1	0
18	182,2	126,66	5,19	2,08	1,48	2,52	0	0	0
35	63,18	55,93	9,7	2,02	1,95	1,76	0	0	0
36	115,24	108,82	25,04	1,88	1,91	1,83	1	0	0
37	104,01	97,74	73,72	1,91	1,91	1,24	1	0	1
38	268,48	179,39	15,49	1,97	1,43	1,77	0	0	1
39	346,37	67,84	20,09	1,71	1,87	1,65	0	0	0
40	251,61	131,07	66,76	1,9	1,5	1,85	0	0	0
42	225,63	61,81	6,61	1,97	1,76	1,62	0	0	0
43	91,51	64,36	29,31	1,85	1,81	1,31	0	0	0
45	259,36	49,65	7,64	1,58	2,08	3,12	0	0	0
48	114,95	85,98	6,12	2	1,56	3,57	0	1	0
49	75,19	92,64	62,64	1,97	1,76	1,2	0	0	0
50	247,4	115,44	54,8	1,8	1,8	1,18	0	0	0
53	72,25	50,58	6,51	1,89	1,95	2,41	0	0	0
54	115,14	61,71	12,1	1,71	1,86	1,25	0	0	0
56	51,07	130,88	8,52	1,75	1,51	1,89	0	0	0
57	122,15	86,42	16,17	1,8	1,79	1,7	0	0	0
58	49,75	62,84	61,66	1,83	1,71	1,17	0	0	1
59	154,85	128,67	55,09	1,84	1,13	1,2	0	0	0
62	39,55	94,6	32,99	1,88	1,91	1,73	1	1	1
63	216,47	46,17	59,6	1,83	1,86	1,2	0	1	0
64	68,97	107,45	12,54	1,58	1,38	1,96	0	0	0
65	119,85	73,48	21,22	1,82	1,66	1,41	0	0	0
68	107,35	119,8	63,43	1,83	1,46	1,22	0	0	0
73	48,97	64,46	4,46	1,61	1,82	3,5	0	0	0
74	127,79	70	13,92	1,87	1,91	1,69	0	0	0
76	198,08	69,36	16,76	1,94	1,87	1,35	0	0	0

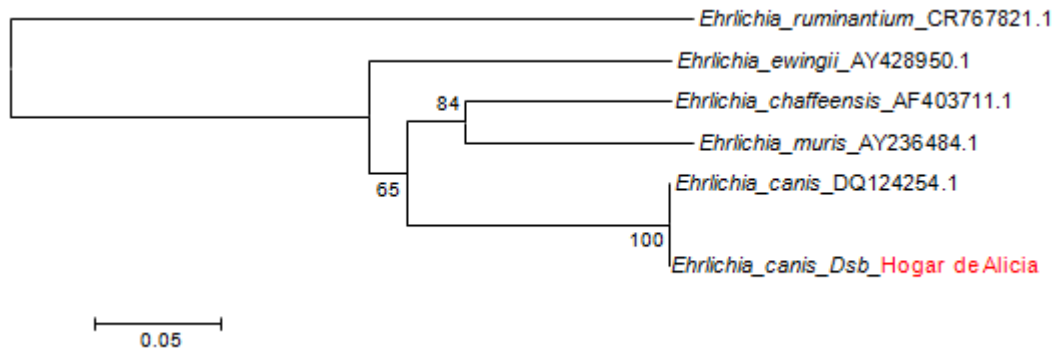
	79	276,61	77,99	4,41	1,9	1,71	9	0	0	0
	81	412,79	67,45	78,33	1,88	1,86	1,14	0	0	0
	82	84,46	83,72	15,24	1,86	1,31	2,2	0	0	0
	83	313,28	83,87	11,76	1,88	1,83	2,14	0	0	0
	89	69,36	69,16	65,19	1,83	1,82	1,22	0	0	1
	90	125,63	71,96	81,86	1,74	1,89	1,23	0	0	0
	91	56,07	90,53	6,07	1,69	1,3	1,01	1	0	0
	92	154,85	159,21	95,39	1,75	1,51	1,11	0	0	0
	94	77,05	67,54	62,05	1,6	1,77	1,23	0	0	0
	98	199,36	90,68	77,74	2,03	1,87	1,22	0	0	0
	100	297	50,19	65,98	2,05	1,79	1,18	0	0	1
\bar{X}		149,34	86,72	33,68	1,85	1,75	1,82			
TOTALES	46							6	5	6

Caninos muestreados calidad del ADN extraído de coágulo, sangre entera con EDTA y capa flogística, y resultados de PCR.

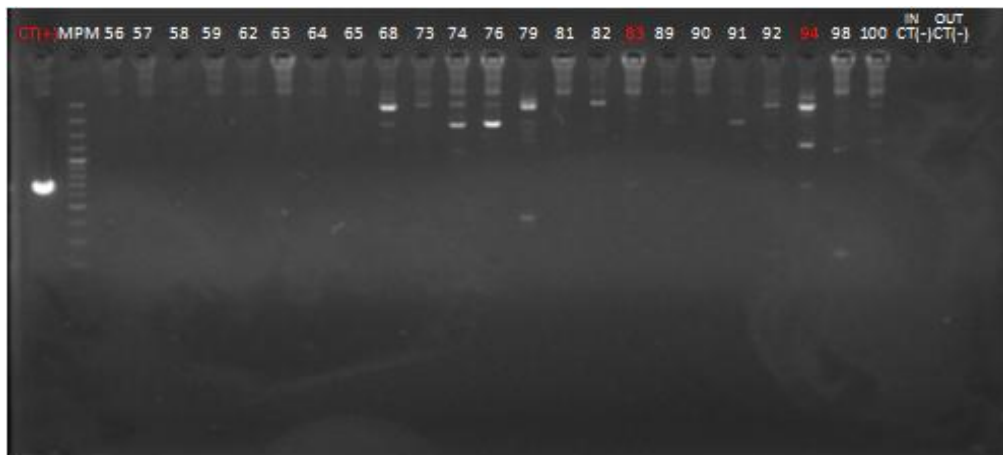
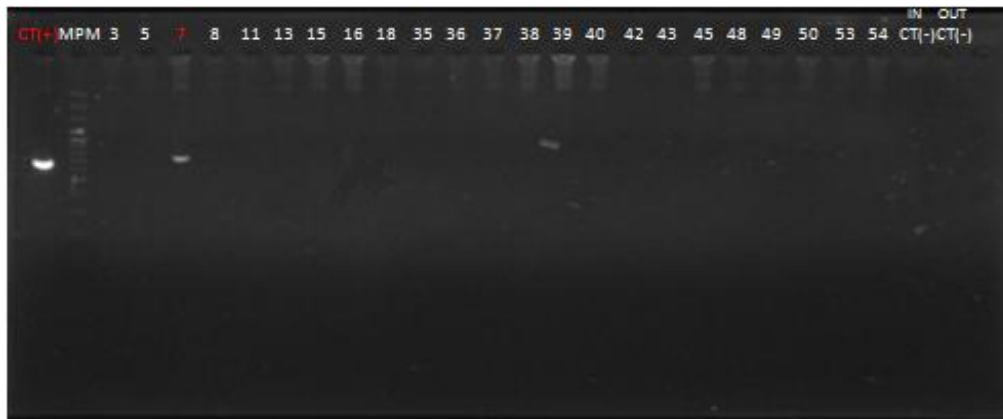
Apéndice D. Productos de PCR *Ehrlichia canis*



Apéndice E. Árbol filogenético



Árbol filogenético realizado por el método Neighbor-Joining con el gen Dsb (290 nucleótidos) de *Ehrlichia*. Se usó un bootstrap de 1000 réplicas y el método de la distancia de **P** para el cálculo de la distancia evolutiva. El análisis fue realizado en el programa MEGA 6.1 y el árbol está enraizado en el punto medio.

Apéndice F. Productos de PCR *Anaplasma platys*

Apéndice G. Pruebas de SNAP 4DX

N° MUESTRA	Prueba SNAP 4 Dx				
	Control	<i>A. phagocytophilum/platys</i>	<i>E. canis/ewingii</i>	<i>D. immitis</i>	<i>B. burgdorferi</i>
3	1	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0
8	1	0	0	0	0
11	1	0	0	0	0
13	1	0	0	0	0
15	1	0	0	0	0
16	1	0	1	0	0
18	1	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0
36	1	0	0	0	0
37	1	0	0	0	0
38	1	0	0	0	0
39	1	0	0	0	0
40	1	0	0	0	0
42	1	1	0	0	0
43	1	0	0	0	0
45	1	0	0	0	0
48	1	0	0	0	0
49	1	0	0	0	0
50	1	0	0	0	0
53	1	0	0	0	0
54	1	0	0	0	0
56	1	0	0	0	0
57	1	0	0	0	0
58	1	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0
62	1	0	1	0	0
63	1	0	0	0	0
64	1	0	0	0	0
65	1	0	0	0	0
68	1	0	0	0	0
73	1	0	0	0	0
74	1	0	0	0	0
76	1	0	0	0	0
79	1	0	0	0	0

81	1	0	0	0	0
82	1	1	1	0	0
83	1	0	0	0	0
89	1	0	0	0	0
90	1	0	0	0	0
91	1	0	0	0	0
92	1	0	0	0	0
94	1	0	0	0	0
98	1	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0
TOTAL	46	3	3	0	0