



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
PUEBLA

DECANATO DE LA VIDA Y LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESPECIALIDAD EN MEDICINA Y CIRUGÍA EN PERROS Y GATOS

“Identificación molecular y factores asociados a las
Infecciones de *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.* en
perros domésticos de la subregión Centro del
estado de Tabasco”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN MEDICINA Y CIRUGIA DE PERROS Y GATOS

PRESENTA:

MVZ. ANDRES MANUEL TORRES SÁNCHEZ

DIRECTOR: DR. OSWALDO MARGARITO TORRES CHABLÉ

PUEBLA, PUEBLA ENERO 2024



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ANEXO 2. VoBo Liberación de Tesis

Dra. en C. Alicia Pamela Pérez Sánchez
Coordinadora de la Especialidad en Medicina y Cirugía en Perros y Gatos
Universidad Popular del Estado de Puebla
PRESENTE

Por este medio hago de su conocimiento que la tesis con título: "Identificación molecular y factores asociados a las infecciones de Ehrlichia spp. y Anaplasma spp. en perros domésticos de la subregión centro del estado de tabasco" que presenta el (la) **C. Andres Manuel Torres Sánchez** egresado de la Especialidad en Medicina y Cirugía en Perros y Gatos con número de ID 3496244 y número de matrícula 16440063 ha sido revisada y se ha comprobado que la información y datos contenidos son originales y verdaderos, no copiados de ningún otro trabajo ya existente, con excepción de los aportes de las propias fuentes bibliográficas, que se encuentran debidamente registradas en la presente y que cumple con los requisitos metodológicos y de contenido, para que pueda ser sometida a examen de grado.

Sin otro particular, envío un cordial saludo

ATENTAMENTE
"LA CULTURA AL SERVICIO DEL PUEBLO"



DR. OSWALDO MARGARITO TORRES CHABLE
PROFESOR INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE
TABASCO, DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.

Nombre y firma del director de tesis

Puebla, Pue. 25 de octubre de 2023



El presente documento titulado **“IDENTIFICACION MOLECULAR Y FACTORES ASOCIADOS A LAS INFECCIONES DE *EHRlichia SPP* Y *ANAPLASMA SPP* EN PERROS DOMESTICOS DE LA SUBREGION CENTRO DEL ESTADO DE TABASCO”** fue supervisado y aprobado por el comité asignado para el examen de posgrado, por lo que no hay inconveniente para que la sustentante **Andres Manuel Torres Sánchez** con ID 3496244 y número de matrícula 16440063, quien ha sido dirigida y orientada por el Dr. Oswaldo Margarito Torres Chable, promueva la obtención del título profesional de **ESPECIALISTA EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE PERROS Y GATOS.**

Dr. Oswaldo Margarito Torres Chable *

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Oswaldo', written over a horizontal line.

Profesor Investigador DACA-UJAT.

Laboratorio de Enfermedades Tropicales y Transmitidas por Vector DACA-UJAT

M en MVZ. Daniela Belem Vázquez Briones *

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniela', written over a horizontal line.

Dra. Alicia Pamela Pérez Sánchez*

* Catedráticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UPAEP.

“LA CULTURA AL SERVICIO DEL PUEBLO”

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ileana', written over a horizontal line.

DRA. ILEANA ZORHAYA MARTÍNEZ AMOS

DIRECTORA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ileanazorhaya.martinez@upaep.mx

PUEBLA, PUEBLA, ENERO 2024

Índice

1. Introducción:	8
2 Revisión de la literatura.....	3
2.1 Historia de <i>Ehrlichia spp.</i>	3
2.1.2 Etiología	3
2.1.3 Especies de Ehrlichia con capacidad patogénica.....	4
2.1.4 <i>Ehrlichia canis</i>	4
2.1.5 Epidemiología de <i>E. canis</i>	5
2.1.6 Especies afectadas por <i>E. canis</i>	5
2.1.7 Vector transmisor de <i>E. canis</i>	6
2.1.8 Patogénesis	6
2.1.9 Diagnóstico de la infección por <i>Ehrlichia canis</i>	7
2.2 Historia de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	8
2.2.1 Generalidades	8
2.2.2 Clasificación taxonómica	9
2.2.3 Características morfológicas	9
2.2.4 Distribución epidemiológica	10
2.2.5 Transmisión y ciclo evolutivo de <i>A. phagocytophilum</i>	11
2.2.6 Patogenia de la infección <i>A. phagocytophilum</i>	14
2.2.7 Signos clínicos en los perros	15
2.2.8 Diagnóstico de la infección <i>A. phagocytophilum</i>	15
2.2.9 Tratamiento y prevención.....	16
3. Planteamiento del problema	17
a)..... Pregunta de investigación	17
b)..... Justificación	17
c)..... Objetivo general y objetivos específicos	17
Objetivo general:	17
Objetivos específicos:.....	17
4. Materiales y métodos.....	18
4.1 Área de estudio:.....	18
4.2 Tamaño de la muestra.....	19
4.3 Toma de la muestra de sangre para la identificación de <i>Ehrlichia spp.</i> y <i>Anaplasma spp.</i>	19
4.4 Extracción de ADN genómico para la identificación de Ehrlichia spp. y Anaplasma spp.	19
4.5 Cebadores y reacción de PCR para identificar Ehrlichia spp. en ADN genómico procedente de sangre de perros	20

4.6 Cebadores y reacción de PCR para identificar <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en ADN genómico procedente de sangre de perros.....	21
4.7 Determinación de la prevalencia de <i>Ehrlichia</i> y <i>Anaplasma</i> spp. en los perros muestreados.	22
4.8 Análisis estadístico para identificar factores asociados a la infección de <i>E. canis</i> y <i>A. phagocytophilum</i> en los perros muestreados.....	23
5. Resultados	24
5.1 Resultados <i>Ehrlichia</i> spp.....	24
6. Discusión.....	25
7. Conclusiones	28
8. Referencias	29

Índice de ilustraciones

Ilustración 1 Distribución de patógenos seleccionados transmitidos por garrapatas detectados por PCR en garrapatas recolectadas mediante arrastre de garrapatas, de humanos y animales en México (Sosa-Gutierrez et al., 2016).	12
Ilustración 2 Ubicación geográfica de la subregión Centro en el estado de Tabasco (elaboración propia).	18

Índice de tablas

Tabla 1 Datos generales de los cebadores y las reacciones de PCR empleados para realizar el diagnóstico de <i>Ehrlichia</i> spp. en los perros muestreados.	21
Tabla 2 Cebadores a utilizar durante el presente estudio.	22
Tabla 3 Predicción de variables asociadas a la infección de <i>Ehrlichia canis</i> mediante regresión logística univarida.	24

Resumen

El presente trabajo se realizó en la subregión de centro en el estado de Tabasco para poder determinar los factores asociados y prevalencia de las enfermedades de *ehrlichia* spp y *anaplasma* spp en perros domésticos. Ya que estas enfermedades se pueden llegar a convertir en un problema de salud pública por su capacidad zoonótica. Los agentes causales de estas enfermedades fueron detectados molecularmente en un periodo de tiempo el cual va de febrero de 2022 a febrero de 2023 donde se muestrearon un total de 223 perros. Para determinar la presencia de bacterias del género *Ehrlichia* spp. en ADN genómico procedente de la sangre de los perros muestreados se utilizaron un par cebadores generales para detectar el género *Ehrlichia* spp. Se utilizaron dos diferentes pares de cebadores uno para la identificación de género (E1, E2) creados partir de una región conservada del gen 16 s rRNA y el segundo par de cebadores para la identificación de especie (MSP465f y MSP980r) originado de una región conservada del gen Msp2. Se muestrearon un total de 223 perros en la subregión Centro del estado de Tabasco. Los resultados de la PCR para *A. phagocytophilum* fueron todos negativos. Con relación a *E. canis* se registró una prevalencia de 8.52% (19/223). Los resultados mostraron una asociación de las variables condición corporal (< 3) y la procedencia del perro (rural). En comunidades rurales de Yucatán, en México la prevalencia de *E. canis* ha sido mayor (29.26%) a lo reportada en el presente estudio. En general, las pruebas moleculares se han destacado por ser altamente específicas para detectar este tipo de patógenos al compararse con pruebas serológicas. Sin embargo, existe una gran cantidad de reportes de seroprevalencia de *E. canis* en perros de diferentes partes del mundo. De las variables estudiadas en el presente trabajo, dos variables fueron significativamente asociadas a la infección: condición corporal <3 y pertenecer a una zona rural. La relevancia de este trabajo es obtener una prevalencia de estas enfermedades ya que no se tenía registro previo de ello.

1. Introducción:

Las especies *rickettsiales* transmitidas por garrapatas se consideran infecciones zoonóticas causadas por géneros del orden *Rickettsiaceae*, principalmente *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis* convirtiéndose en un problema de salud pública y veterinaria (Sosa-Gutierrez et al., 2016). *Anaplasma phagocytophilum* es una bacteria gram negativa intracelular obligada, pleomórfica perteneciente a la familia *Anaplasmataceae* que invade principalmente neutrófilos y eosinófilos de hospederos mamíferos incluido el perro y hombre, ocasionando una enfermedad aguda y febril (Caspersen et al., 2002; Carrade et al., 2009).

El agente causal de la *ehrlichiosis* es una bacteria gram negativa del género *Ehrlichia spp.* caracterizada por ser un microorganismo intracelular obligado que se transmite por garrapatas a animales mamíferos (Movilla et al., 2016). Es de suma importancia destacar que las infecciones por *Ehrlichia spp.* son capaces de infectar a personas y estas pueden ser *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, en algunos casos han conducido a la muerte de personas (Buller et al., 1999; Martin et al., 1999; Rojas et al., 2015). La distribución de las infecciones causadas por *Ehrlichia spp.* en perros es considerada cosmopolita. En el continente europeo ha sido encontrada en Portugal, Rumania, España, Suiza y Turquía (Sainz et al., 2015). En el continente americano ha sido reportado en Estados Unidos de América, México, Colombia, Costa rica, Brasil y Argentina (Eiras et al., 2013; Vargas-Hernández et al., 2012; Movilla et al., 2016).

Anaplasma phagocytophilum fue identificada por primera vez en California en 1982 como agente infeccioso en caninos, posteriormente se reportó anaplasmosis granulocítica en humanos (AGH) en los Estados Unidos de América en 1993 (Madewell and Gribble, 1982). Desde entonces ha sido reportada en todo el mundo (Stuen et al., 2013). Estudios en México han reportado la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma phagocytophilum* en perros del estado de Nuevo León y evidencia molecular de su presencia fue reportada en zarigüeyas y perros muestreados en el estado de Campeche con prevalencia de 3 y 27% respectivamente (Salinas-Meléndez et al., 2014; Rojero-Vázquez et al., 2017).

Un estudio retrospectivo realizado en 2015 reportó una incidencia de 26% de AGH en 150 muestras de pacientes pediátricos identificados por PCR. Los datos reportaron una estrecha

asociación entre las infecciones y el contacto cercano con perros, destacando así el riesgo potencial para la salud de los humanos (Ogaz-Campos, 2015).

estados como Yucatán, Coahuila y Sinaloa (Díaz-Medina et al., 2016; Sosa-Gutierrez et al., 2016).

Una gran cantidad de perros que se presentan en clínicas veterinarias de México, principalmente aquellos con signología de padecer enfermedades transmitidas por vectores han resultado con títulos elevados de anticuerpos contra *E. canis* (Movilla et al., 2016). Sin embargo, en el estado de Tabasco no existe evidencia que sustente la prevalencia actual de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. en perros y los factores asociados a estas infecciones. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente la presencia de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. en sangre de perros domésticos de la subregión Centro del estado de Tabasco, además determinar prevalencia y algunos factores asociados a estas infecciones.

2 Revisión de la literatura

2.1 Historia de *Ehrlichia spp.*

De acuerdo con la literatura existen dos momentos importantes en el estudio y descubrimiento de *Ehrlichia canis*, en Europa fue identificada por primera vez en 1935 en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard. Esta primera identificación surgió posterior a observar infestaciones de garrapatas en perros alojados en sus instalaciones. Los perros desarrollaron un proceso febril agudo que cursaba con anemia similar a lo reportado en la actualidad en perros infectados por *Ehrlichia spp* (Zhang et al., 2008). Posteriormente, en el año 1945, la Ehrlichiosis canina fue reconocida y nombrada así en honor al bacteriólogo alemán Paul Ehrlich (Ogden et al., 1998). Luego fue reportada en 1960 en Singapur y Vietnam, y subsecuentemente, en 1963 en el Estado de Oklahoma, EE.UU. en el cuartel militar de Nueva Yersey y luego en otros Estados de América del Norte (Zhang et al., 2008). En la actualidad, *Ehrlichia canis* tiene una reconocida distribución mundial ya que ha sido reportada en países de África, Europa, Asia y a lo largo del continente americano (Vargas-Hernández et al., 2012).

2.1.2 Etiología

Ehrlichia canis es el agente etiológico de la erlichiosis monocítica canina, también conocida como EMC. Se trata de una enfermedad multisistémica grave y a veces fatal que afecta a miembros de la familia *Canidae*, la cual incluye a los perros, lobos, coyotes y zorros. Es actualmente considerada predominante en perros domésticos y es transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus s. l.* (Ferrolho et al., 2016).

E. canis pertenece al género *Ehrlichia*, familia *Anaplasmataceae*, orden *Rickettsiales*, y *Phylum* Proteobacteria (Ferrolho et al., 2016). La enfermedad producida por *Ehrlichia canis* en perros, recibe diferentes acepciones que dependen de la ubicación geográfica e historia de descubrimiento en cada entidad. Sin embargo, actualmente, y posterior al estudio de la evolución se sabe que es una enfermedad bien diferenciada de las causadas por otros agentes de la misma familia (Ferrolho et al., 2016).

El agente infeccioso puede ser observado formando mórulas intracelulares en monocitos y al afectar al huésped produce un cuadro patogénico caracterizado por: síndromes febriles, trombocitopenia, organomegalia uveítis anterior, artritis, meningitis, falla renal e incluso la muerte (McBride and Walker, 2011). *E. canis*, al igual que el resto de las especies de *Ehrlichia spp.* es una

bacteria cocoide pleomorfa Gram negativa de aproximadamente 0.5 μm de diámetro, que se comporta como una bacteria intracelular que infecta principalmente leucocitos (monocitos y granulocitos) formando racimos de organismos conocidos como mórulas (McBride and Walker, 2011).

2.1.3 Especies de Ehrlichia con capacidad patogénica

Las bacterias del género *Ehrlichia* infectan diferentes células hematopoyéticas, nombrándose a las enfermedades, según las células sanguíneas infectadas. *E. canis* y *E. chaffeensis* afectan monocitos y linfocitos, mientras que *E. ewingii* tiene especial tropismo por granulocitos (Dolz et al., 2013). El tamaño del genoma de las especies de *Ehrlichia* es relativamente pequeño (0.8 a 2.5Mb). Los progresos en tecnología molecular han permitido avances en el desarrollo de análisis genéticos, indicando la verdadera posición filogenética de la mayoría de organismos del orden *Rickettsiales*, de tal manera que *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* y *E. muris* han sido ubicadas dentro de un mismo género, por presentar una similitud de al menos 97.7% en su secuencia genética del segmento 16S de ARNr (ribosomal), mientras que *A. platys*, *A. phagocytophilum* y *A. bovis*, anteriormente reconocidos como miembros del género *Ehrlichia* (*E. platys*, *E. phagocytophila* y *E. bovis*), pasaron a formar parte del género *Anaplasma* por presentar similitudes de al menos 96.1% en sus secuencias genéticas del gen 16S de ARNr (Dolz et al., 2013). Las especies de *Ehrlichia* que son considerados patogénicas en la actualidad son: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* y *Ehrlichia ruminantium* (Esemu et al., 2011). En humanos y perros se han reportado infecciones emergentes con *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis* y *E. muris* (Johnson et al., 2015).

2.1.4 Ehrlichia canis

Ehrlichia canis es una bacteria intracelular transmitida mediante mecanismo de parasitario, es el agente causal de la Erlichiosis Monocítica Canina (Díaz-Medina et al., 2016). Otras sinonimias que se le otorgan a la erlichiosis canina son fiebre hemorrágica canina, tifus canino, enfermedad del perro rastreador y pancitopenia tropical canina (Dubie et al., 2014). En la actualidad, este patógeno ha sido reportado como agente infeccioso en caninos domésticos y salvajes, y en el ser humano en prácticamente todo el mundo (Dubie et al., 2014).

En los Estados Unidos de Norte América fue reportada por primera vez en 1963 (Magnarelli et al., 1990), y desde entonces ha sido hallado con una amplia distribución en caninos domésticos de estados en Estados Unidos de Norteamérica, Centroamérica y en otras regiones del sur del continente americano, con un número de reportes que al parecer va en creciente aumento (Beall et al., 2012). Aunque, como se menciona, aparece primariamente en perros, *E. canis* también ha sido documentada en felinos y humanos, hacia donde es transmitido principalmente por medio de la garrapata marrón del perro denominada *Rhipicephalus sanguineus s.l.* (Little et al., 2014).

2.1.5 Epidemiología de *E. canis*

E. canis como se ha mencionado con anterioridad tiene una distribución mundial aunque se atribuye una mayor prevalencia en áreas tropicales y subtropicales donde el vector es abundante (Beall et al., 2012). Algunos estudios han considerado que los perros adultos tienen un mayor riesgo de adquirir la infección lo cual puede a la vez estar correlacionado con una mayor frecuencia de exposición a garrapatas a lo largo de la vida del perro (Huerto-Medina y Damaso-Mata, 2015). Ha sido reportada una mayor prevalencia en perros de raza Pastor Alemán, aunque otros estudios no revelan diferencias entre razas ó género (Ansari-Mood et al., 2015). Otros factores asociados positivamente con la infección de *E. canis* son un mayor número de perros por casa, ser infestado por garrapatas más de una ocasión, permanecer a fuera de la casa, pudiendo manifestar una actitud depresiva y fiebre (Barrantes-González et al., 2016). Se ha reportado que la enfermedad puede desarrollar varias fases: aguda, subclínica y crónica; así como también signos clínicos variables y en algunos casos inespecíficos, los cuales dependerán de múltiples factores como la ya mencionada respuesta inmune, además de otros factores como la cepa del agente causal (Ansari-Mood et al., 2015).

2.1.6 Especies afectadas por *E. canis*

E. canis afecta principalmente al perro doméstico. Sin embargo, se ha reportado como un agente capaz de infectar a una gran variedad de cánidos salvajes como: lobos (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*) y perros salvajes (*Lycaon pictus*), zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*), zorros rojos (*Vulpes fulva*) y chacales (*Canis mesomelas*) (Price, 1980). En el hombre la infección por *E. canis* fue descubierta por primera vez en 1986 mediante observación morfológica de mórulas y estudios serológicos (Dubie et al., 2014).

2.1.7 Vector transmisor de *E. canis*.

Rhipicephalus sanguineus s.l. conocida comúnmente como la garrapata café o marrón del perro ha sido reportada como el vector con mayor eficiencia para transmitir la infección de *E. canis* (Fourie et al., 2013). Las garrapatas de esta especie pueden mantener la infección de *E. canis* de manera transestadial (de larva a ninfa ó de ninfa a garrapata adulta en el mismo individuo). Sin embargo, la infección de garrapatas de manera transovárica no se lleva a cabo en esta especie de garrapata. La transmisión de *E. canis* a perros domésticos ha sido evaluada y se ha encontrado que la infección puede llevarse a partir de las primeras ocho horas posteriores a la primera alimentación de la garrapata en el perro (Fourie et al., 2013). Otras especies de garrapatas que se han encontrado infectadas por *E. canis* son *Dermacentor variabilis* y *Haemaphysalis leporis-palustris* (Sosa-Gutiérrez, 2016). Aunque su capacidad vectorial no ha sido actualmente evaluada.

2.1.8 Patogénesis

La patogenia de la erlichiosis canina consiste en un período de incubación de 8 a 20 días, seguido secuencialmente por fases agudas, subclínicas y, en algunos casos, crónicas. La enfermedad puede manifestarse por una amplia variedad de signos clínicos, de los cuales las más comunes son depresión, letargo, pérdida de peso, anorexia, pirexia, linfadenomegalia, esplenomegalia y hemorragias principalmente por epistaxis (Harrus et al., 1999). Las principales anomalías hematológicas incluyen trombocitopenia, anemia y leucopenia leves durante la etapa aguda, trombocitopenia leve en la etapa subclínica y pancitopenia en la etapa crónica grave. Las principales anomalías bioquímicas incluyen hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia (Harrus et al., 1999). Se considera que la trombocitopenia es la anomalía hematológica más común y constante de los perros infectados natural o experimentalmente con *E. canis* (Waner et al., 1995).

La trombocitopenia en CME se atribuye a diferentes mecanismos en las diferentes etapas de la enfermedad. Los mecanismos que se cree están involucrados en la patogénesis de la trombocitopenia en la fase aguda de la enfermedad incluyen un aumento del consumo de plaquetas debido a cambios inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos, un aumento del secuestro esplénico de las plaquetas y una destrucción o lesión inmunológica que resulta en una disminución significativa de la vida de las plaquetas (Smith et al., 1975). Los estudios que utilizan radioisótopos han demostrado que el tiempo de supervivencia de las plaquetas disminuyó de una media de 9 días a 4 días, 2 a 4 días después de la infección con *E. canis* (Waner et al., 1995).

La hipoalbuminemia, la hiperglobulinemia y la hipergammaglobulinemia son las anomalías bioquímicas predominantes encontradas en perros infectados con *E. canis* (Harrus et al., 1999). La hipoalbuminemia observada en la erlichiosis canina puede ser la consecuencia de la pérdida periférica de albúmina a los líquidos inflamatorios edematosos como resultado del aumento de la permeabilidad vascular, la pérdida de sangre o la disminución de la producción de proteínas debido a una enfermedad hepática leve concurrente, o puede ser por glomerulopatía de cambio mínimo (Harrus et al., 1999). Como la síntesis de albúmina está regulada por la presión oncótica, la disminución de las concentraciones de albúmina puede actuar como un mecanismo compensatorio para el estado hiperglobulinémico, manteniendo así la presión oncótica y evitando un aumento de la viscosidad de la sangre (Harrus et al., 1999).

Los cambios en la patogenia a partir de que la infección ha alcanzado a infectar las células sanguíneas, puede ser modificada dependiendo de la condición general del perro, la existencia de otras patologías concomitantes, la instauración de un tratamiento adecuado o bien desencadenar en múltiples complicaciones hematológicas y en órganos del animal que ocasionan la muerte por fallas multisistémicas (Esemu et al., 2011).

2.1.9 Diagnóstico de la infección por *Ehrlichia canis*.

En el diagnóstico definitivo de CME se pueden utilizar diferentes tipos de pruebas diagnósticas como la visualización de mórulas en monocitos mediante citología, la detección anticuerpos en suero, test de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta, Western blot y reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Dubie et al., 2014). En la citología, *E. canis* se tiñe de azul oscuro a púrpura con tinciones tipo Romanowsky. Las morulas son bien definidas, redondas a ovales, aparecen como cuerpos de inclusión basofílicos a eosinofílicos con una membrana bien delineada dentro de las células mononucleares del hospedador (Dubie et al., 2014). Sin embargo, la evaluación mediante frotis proporciona una sensibilidad máxima de un 66% lo cual, lo coloca en desventajas al compararse con técnicas serológicas o moleculares (Vargas-Hernández et al., 2012).

En perros infectados experimentalmente con *E. canis*, la prueba de inmunofluorescencia **indirecta** ha detectado anticuerpos séricos tan pronto como 7 días después de la Infección inicial. Aunque algunos perros no se conviertan en seropositivos hasta 28 días después de la infección. Por tanto, ha sido considerado que si los signos clínicos indican erlichiosis canina en un perro seronegativo,

la serología debe repetirse en 2-3 semanas. En el pasado, se han considerado títulos de anticuerpos IgG de > 1:80 como perros positivos a la infección, pero la mayoría de las investigaciones recientes indican que los títulos <1:80 deben ser considerados como sospechosos y la serología debe repetirse en 2-3 semanas, o bien una PCR o Western blot deben ser considerados (Movilla et al., 2016).

2.2 Historia de *Anaplasma phagocytophilum*

A. phagocytophilum fue descrita por primera vez en 1932 durante un estudio de virus en ovejas de Escocia. Fue identificada en leucocitos de ovejas y la patología fue nombrada la fiebre transmitida por garrapatas (TBF, por sus siglas en inglés), ya que provocaba un cuadro febril y leucopenia severa. Inicialmente, el agente etiológico fue nombrado *Rickettsia phagocytophila* (Foggie, 2018). La bacteria se diseminó por toda Europa siendo responsable de la fiebre transmitida por garrapatas en rumiantes domésticos (Woldehiwet, 1983). Posteriormente, fue nombrada *Cytoecetes phagocytophila* debido a su predilección por los granulocitos (Madewell and Gribble, 1982).

La infección fue reportada en caballos de California en 1968, responsable de la Erliquiosis Granulocítica Equina (Madigan y Gribble, 1987). La AGC canina fue reportada por primera vez en California en el año de 1982 (Madigan and Gribble, 1987). Los primeros reportes de AGH (descrita como Erliquiosis Granulocítica Humana) fueron realizados en Estados Unidos en 1996 (Chen et al., 1994).

El reconocimiento de que la HGA era causada por un agente estrechamente relacionado con el agente causal de la TBF en rumiantes y la Erliquiosis Granulocítica Equina y la capacidad de estos organismos para invadir y replicarse dentro de los neutrófilos, dio lugar a la reorganización filogenética de las familias Rickettsiaceae y Anaplasmataceae siendo reclasificadas de acuerdo a análisis moleculares de los genes codificadores de la unidad 16S rRNA y de la proteína groESL como una misma especie nombrándola *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler et al., 2001).

2.2.1 Generalidades

El término *Rickettsia* hace alusión a un gran número de bacterias gramnegativas, intracelulares obligadas, que son transmitidas por artrópodos hematófagos. El orden Rickettsiales engloba a dos

gryes familias *Anaplasmataceae* que incluye los géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* y *Neorickettsia* y la familia *Rickettsiaceae* que alberga los géneros *Rickettsia*, *orientia* y *Coxiella* (Bowman, 2011).

A. phagocytophilum es un patógeno zoonótico reemergente que es transmitido por garrapatas, este organismo es el agente etiológico de la HGA, AGC, Anaplasmosis Granulocítica Equina y la TBF de los rumiantes (Stuen et al., 2013).

La anaplasmosis se describe como un grupo de enfermedades febriles agudas, infecciosas, inmunosupresoras, transmitidas por garrapatas y causadas por microorganismos de diferentes especies del género *Anaplasma spp.* (Alberti et al., 2005). *A. phagocytophilum* infecta una gran diversidad de especies hospedadoras, incluidos los humanos, animales silvestres (roedores, carnívoros y venados) y animales domésticos, incluidos perros, vacas, ovejas y caballos. Se ha informado que esta enfermedad puede causar fiebre, anorexia, dolor, neutropenia, trombocitopenia, así como la formación de cuerpos de inclusión citoplasmáticos en los neutrófilos (Engvall et al., 1996).

2.2.2 Clasificación taxonómica

A. phagocytophilum pertenece a la familia Anaplasmataceae, en el orden Rickettsiales y la clase Alphaproteobacteria. La familia anaplasmataceae comprende cinco géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* y *Wolbachia*, y dos géneros menos estudiados, *Cyidatus Neoehrlichia* y *Cyidatus Xenohaliothis*. El género *Anaplasma* está conformado por siete especies: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. caudatum*, *A. bovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* (Dumler et al., 2001). Se ha encontrado una nueva especie de *Anaplasma* llamada *Anaplasma odocolei* sp. nov. se aisló del venado cola blanca cautivo (*Odocoileus virginianus*) en los Estados Unidos (Tate et al., 2013).

2.2.3 Características morfológicas

A. phagocytophilum se describe como un organismo cocos pleomórficos, intracelulares obligados, gramnegativos, que mide 0.2 a 2.0 μm de diámetro. Se encuentra envuelto por dos membranas, la membrana externa es rizada por lo cual crea un espacio periplásmico irregular, y carece de cápsula. Dentro de los granulocitos infectados, la bacteria está presente en forma de macrocolonias (mórulas) en el interior de vacuolas intracitoplasmáticas, donde esta se replica. Las mórulas varían de 1.5 μm y 6 μm de diámetro (Atif, 2015).

La bacteria puede estar fuertemente empaquetada dentro de las inclusiones, debido a una pérdida del peptidoglicano y lipopolisacárido (LPS). La pérdida le confiere la capacidad para que las bacterias se expriman dentro de un espacio intravascular limitado mientras mantienen la plasticidad de los granulocitos infectados que se requieren para la circulación capilar (Lai et al., 2009). Las hebras finas de ADN y los ribosomas se ven claramente dentro de las bacterias. Se tiñe mal con la tinción de Gram, estas se tiñen mejor con la tinción de Giemsa o Leishman. La tinción de Romanowsky tiñe las bacterias de color púrpura, lo que permite la visualización de las mórulas (Popov et al., 1998).

A. phagocytophilum pueden presentar dos formas, pequeñas células de núcleo denso que posee actividad de unión celular y la capacidad de ingresar en las células huésped y células reticuladas, las cuales se multiplican dentro de la célula huésped, y vuelven a madurar a células densas que son liberadas, tras la lisis de la célula huésped (Lai et al., 2009).

2.2.4 Distribución epidemiológica

La AGC ha sido documentada esporádicamente en todo el mundo (Bexfield et al., 2005). En Europa el patógeno se ha detectado en las garrapatas de la mayoría de los países y las tasas de infección oscilan entre el 0:4% y el 67% (Stuen, 2007). Ha sido reportada en Alemania (Chirek et al., 2017), Francia (Pantchev et al., 2009), Australia (Kirtz et al., 2007), Italia (Pennisi et al., 2012), España (Solano-Gallego et al., 2006), Portugal (Santos et al., 2009), en países escandinavos (Jäderlund et al., 2007), países de Europa central (Carrade et al., 2009), Europa oriental (Pantchev et al., 2009; Pantchev et al., 2015) y países bálticos (Berzina et al., 2013).

En Asia solo se han realizado pocos estudios en países como China (Cao et al., 2000), Japón (Ybañez y Inokuma, 2016), Corea (Han et al., 2018), India (Borthakur et al., 2014), Turquía (Günaydin et al., 2018) e Irán (Bahrami et al., 2018) aunque parece probable que India sea endémica para este microorganismo (Stuen, 2007).

En África son pocos los artículos publicados sobre la aparición de *Anaplasma phagocytophilum* (Teshale et al., 2018) solo se ha reportado en Ugya (Muhanguzi et al., 2010), Tunes (Sarih et al., 2005) y Etiopia (Teshale et al., 2015)

En los EUA se considera un problema de salud remergente, *Anaplasma* es reportada con frecuencia

en los estados del medio oeste y noreste de EUA donde se ha reportado un aumento de la infección de perros por *Anaplasma spp* (Galemore et al., 2018). La infección se ha reportado con menor frecuencia en América del Sur en países como Colombia, Venezuela, Paraguay Argentina y Costa Rica (Dumler, 2013).

En México, se han realizado algunos estudios sobre la prevalencia de *A. phagocytophilum* en diferentes estados del país. Se demostró la presencia de esta bacteria en 22 estados del país, siendo este el patógeno más comúnmente detectado y estimaron una prevalencia de 11% (Sosa-Gutiérrez et al., 2014; Sosa-Gutierrez et al., 2016). Así también, Movilla et al. (2016) reportaron por examen serológico una prevalencia de *Anaplasma spp* de 9.9%, con la prevalencia más alta detectada en el noroeste (16.4%) y la más baja en los estados del centro norte del país (0.6%).

Otros estudios han reportado la presencia de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* en perros en el estado de Monterrey (Salinas-Meléndez et al., 2014). En el estado de Campeche se realizó un estudio donde encontraron, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una prevalencia de *A. phagocytophilum* de 3 y 27% en zarigüeyas y perros, respectivamente (Rojero-Vázquez et al., 2017). Un estudio informó la presencia de *A. phagocytophilum* en roedores silvestres del centro del país, destacó el riesgo potencial para los humanos y la vida silvestre (Sosa-Gutierrez et al., 2016).

2.2.5 Transmisión y ciclo evolutivo de *A. phagocytophilum*

A. phagocytophilum se mantiene en ciclos naturales, donde están involucradas las garrapatas duras ixodidae y hospedadores vertebrados (Sosa-Gutiérrez et al., 2014). Las garrapatas son parásitos hematófagos de una gran variedad de hospederos vertebrados incluido reptiles y humanos, su importancia radica en que son vectores potenciales de enfermedades de importancia en salud pública (Bowman, 2011).

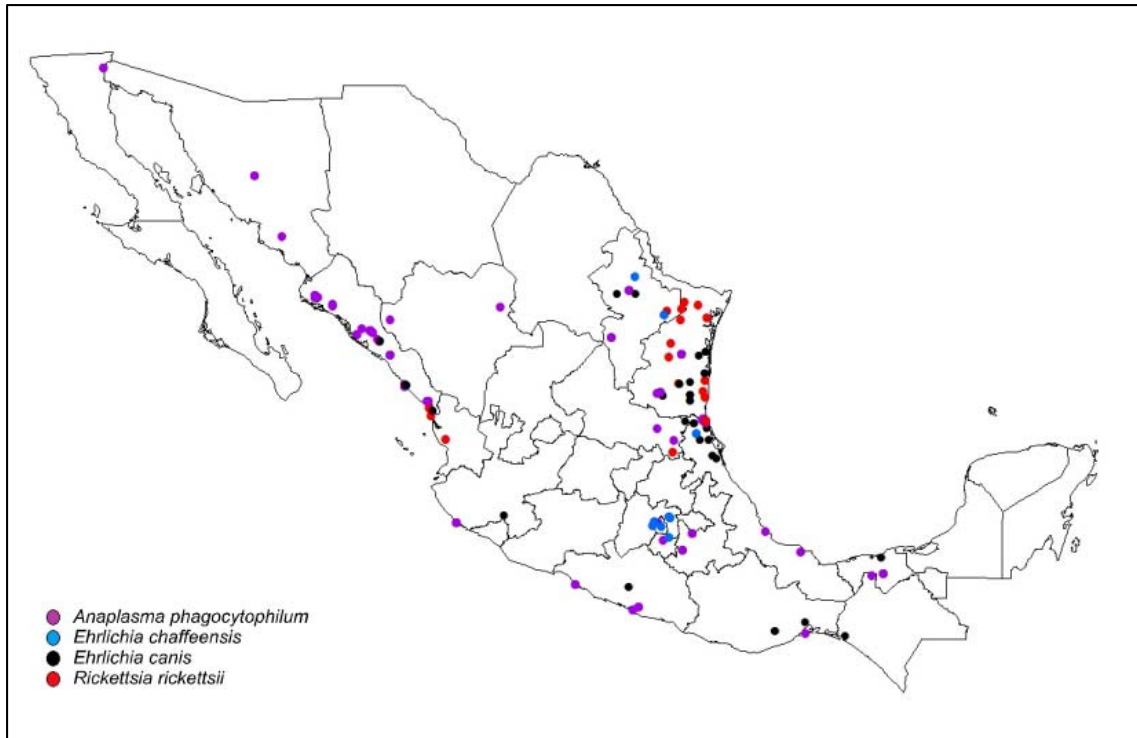


Ilustración 1 Distribución de patógenos seleccionados transmitidos por garrapatas detectados por PCR en garrapatas recolectadas mediante arrastre de garrapatas, de humanos y animales en México (Sosa-Gutierrez et al., 2016).

Las garrapatas son responsables de la transmisión de la bacteria a los huéspedes mamíferos por medio de la picadura durante su alimentación. *A. phagocytophilum* se mantiene dentro de la garrapata desde la etapa de ninfa hasta adulta (transmisión transestadial), por lo que puede transmitir la bacteria que se alimenta de otro huésped. Estos nuevos hospedadores infectados serán la fuente de infección para la siguiente generación de larva (Zhi et al., 2002).

No hay evidencia de transmisión transovárica (de adultos a huevos), las larvas no pueden transmitir la bacteria, pero sí las ninfas infectadas y las garrapatas adultas (Telford et al., 1996). Por ello las tasas de infección reportadas en muchos estudios son más altas en las garrapatas adultas que en las ninfas. Sin embargo, se ha demostrado que la transmisión transovárica de *A. phagocytophilum* se produce a alta frecuencia (hasta un 40%) para *Dermacentor albipictus* en los Estados Unidos. No obstante, en condiciones experimentales las garrapatas larvarias F1 infectadas que se criaron hasta la madurez no pudieron transmitir las bacterias a su progenie larvaria F2 (Baldrige et al., 2009).

En raras ocasiones se ha notificado la transmisión de *A. phagocytophilum* en ausencia de un vector de garrapata. La transmisión nosocomial del organismo se informó recientemente en China (Zhang

et al., 2008). Una investigación de brote sugirió que la transmisión se produjo a través del contacto directo y cercano con la sangre y las secreciones respiratorias de un paciente que murió de AGH. También se describen la posible transmisión de *A. phagocytophilum* a humanos de forma transplacentaria y después de la transfusión de sangre (Kemperman et al., 2008). La infección perinatal con *A. phagocytophilum* se describió en una perra de Wisconsin con un feto momificado retenido. No se documentó evidencia de infección en los cachorros sobrevivientes de la camada (Plier et al., 2009).

A. phagocytophilum es transmitida por varias especies de garrapatas del género *Ixodes*, las especies varían de acuerdo con la región geográfica, así como de los factores ambientales que ocurren en dichas áreas geográficas. En Europa el vector principal es la especie *Ixodes ricinus* (Macleod y Gordon, 1933). En Asia *Ixodes persulcatus* y *Dermacentor silvarum* son los principales vectores (Ohashi et al., 2005). En EUA se ha reportado que los principales vectores son *Ixodes pacificus* en el oeste de los Estados Unidos, *Ixodes scapularis* en la parte superior del medio oeste y el noreste (Dantas-Torres et al., 2012).

En México se ha descrito la garrapata *Ixodes scapularis* distribuida en el Noreste e *I. pacificus* en la costa Noreste, así como *Amblyomma americanum* en Tamaulipas y Jalisco. Sin embargo, se ha reportado que la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) es un importante vector de *A. phagocytophilum* en México, su distribución en todo el territorio nacional y sus características de adaptación la convierten en un vector idóneo (Prado-Ávila et al., 2018).

El ciclo de vida de las garrapatas Ixodidae se inicia con la eclosión del huevo ovopositado por la hembra grávida, del cual emerge la larva, después de una semana aproximadamente de ser ovopositada necesita un hospedador del cual alimentarse; el periodo de alimentación es corto, y se alimenta principalmente de pequeños mamíferos (Waladde et al., 1996)(Waladde et al., 1996). Después, la larva cae al suelo para realizar la muda a ninfa y se alimenta de otro hospedador, en garrapatas de dos hospedadores pueden realizar la metamorfosis en el mismo hospedador y luego dejarse caer. Las ninfas desarrolladas después de la muda de la larva, tienen sus mismas características, excepto que pueden vivir por más tiempo. En las especies de garrapatas de uno y de dos hospedadores, la ninfa se alimenta de sangre del hospedador y muda sobre él en un corto periodo de tiempo, mientras en las garrapatas de tres hospedadores, la ninfa cae al suelo, donde puede mudar dentro de las próximas dos semanas o después de varios meses (Padgett and Lane, 2001).

En el estado adulto se presenta la diferenciación sexual de las garrapatas, en esta etapa se alimentan principalmente de mamíferos más grandes (rumiantes domésticos). El comportamiento de los adultos de garrapatas que mudan en el suelo en el estado de ninfa (garrapatas de tres hospedadores), es similar a sus estados larvales y ninfales y solo se diferencia de estos porque pueden permanecer por períodos largos de tiempo sin alimentarse (Echeverry y Ríos Osorio, 2016). La cópula de las garrapatas duras se da sobre el hospedador, después de lo cual la garrapata hembra se repleta de sangre y cae a la vegetación, donde busca un lugar húmedo y protegido en el cual poner sus huevos, después de esto la garrapata hembra muere. La duración de este ciclo depende de la adaptación de las especies de garrapatas duras a la temperatura, la humedad y la disponibilidad de hospedadores (Bowman, 2011).

Existen diversas cepas de *A. phagocytophilum* en la naturaleza, y las susceptibilidades de las especies de mamíferos a las cepas de *A. phagocytophilum* varían. En garrapatas del género *Ixodes spp* este microorganismo no puede ser transmitido de forma transovárica. Por lo tanto, las larvas no están infectadas. Las garrapatas en la etapa larvaria, ninfa o adulta adquieren cepas de *A. phagocytophilum* a través de la alimentación de sangre en animales infectados. Una vez infectado en la etapa larvaria o ninfa, *A. phagocytophilum* se mantiene en garrapatas a través de la metamorfosis y muda a la siguiente etapa de la vida y se transmite a los animales a través de la alimentación de sangre cuyo el animal huésped es susceptible a la cepa particular. Los seres humanos son susceptibles a solo cepas limitadas, son el huésped sin salida de *A. phagocytophilum* y no son una parte normal del ciclo de vida de *A. phagocytophilum* o garrapatas. La susceptibilidad de las especies animales a las putativas cepas de *Anaplasma* mostradas es una propuesta, la mayoría de las cuales no se ha probado experimentalmente (Rikihisa, 2011).

2.2.6 Patogenia de la infección *A. phagocytophilum*

Las garrapatas adquieren *A. phagocytophilum* al alimentarse de un hospedador infectado, esta debe permanecer adherida durante 36 a 48 h para que se realice la trasmisión (Nyarko et al., 2006). En las garrapatas *Ixodidae* la bacteria sobrevive en las glándulas salivales y en las células del intestino medio. La bacteria presenta dos variaciones morfológicas, pequeñas células de núcleo denso (DC) que contienen protoplasma condensado, las cuales se unen a células granulocíticas del huésped, la cual es la forma infectante, y las células reticuladas (RC) que se multiplican intracelularmente y posteriormente maduran en células de núcleo denso que se liberan tras la lisis celular (Troese et al.,

2011). *A. phagocytophilum* es una de las pocas bacterias conocidas que sobreviven y se replican dentro de los granulocitos de neutrófilos (Chapman et al., 2006).

Durante la picadura de garrapata, *A. Phagocytophilum* obtiene acceso al torrente sanguíneo, donde alcanza el entorno intracelular necesario para su replicación y colonización del huésped. Infecta a los granulocitos, predominantemente neutrófilos, donde se replica en vesículas unidas a la membrana, formando microcolonias llamadas mórulas. Sin embargo, *A. phagocytophilum* también se ha vinculado a las células endoteliales (Munderloh et al., 2004).

A. phagocytophilum posee estrategias de supervivencia intracelular, incluida la inhibición de la función fagosoma-lisosoma para prevenir la destrucción mediada por células, así como la evasión de la inmunidad adaptativa del huésped mediante la presentación en serie de variantes genéticas (Dumler et al., 2001).

La infección por *A. phagocytophilum* se asocia más comúnmente con el desarrollo de trombocitopenia leve a moderada, aunque también pueden ocurrir otras citopenias, como neutropenia, linfopenia y anemia leve (Carrade et al., 2009).

2.2.7 Signos clínicos en los perros

La mayoría de los perros infectados naturalmente con *A. phagocytophilum* probablemente permanezcan sanos (Beall et al., 2012). Los signos clínicos más comunes en perros infectados con *A. phagocytophilum* que desarrollan una enfermedad son letargo y fiebre, que se producen después de un período de incubación de 1 a 2 semanas. Se ha informado letargo en casi todos los perros afectados (Poitout et al., 2005). La hiporexia o anorexia ha sido reportada en un rango de 47 a 88% de los perros. Los signos musculoesqueléticos, como la renuencia a moverse y la cojera, se han reportado con frecuencia. Es menos común la polidipsia, mucosas pálidas. Se han reportado signos gastrointestinales que incluyen vómito y diarrea, y hemorragia que se manifiesta como petequias mucosas, melena o epistaxis (Chirek et al., 2017). Es posible que se presente esplenomegalia y linfadenopatía leve, detectadas durante el examen físico o después de una imagen radiográfica o ecográfica (Chirek et al., 2017).

2.2.8 Diagnóstico de la infección *A. phagocytophilum*

La detección directa de *A. phagocytophilum* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

(PCR, por sus siglas en inglés) es el método más sensible (Chapman et al., 2006). Los estudios experimentales han demostrado que el ADN de *A. phagocytophilum* se puede detectar en la sangre tan pronto como dos días después de la infección (Scorpio et al., 2011). Sin embargo, un resultado negativo no excluye a *A. phagocytophilum* como agente causal.

La detección microscópica de mórulas en un frotis de sangre es menos sensible que la PCR, y solo es posible durante la fase aguda de la infección (~ 4 a 14 días después de la infección), y no todas las infecciones muestran mórulas detectables (Eberts et al., 2011).

La medición de anticuerpos mediante el ensayo de inmunofluorescencia (IFAT) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se puede usar para la detección indirecta de *A. phagocytophilum* con la limitación de que las pruebas de anticuerpos pueden ser negativas durante la fase aguda de la infección debido al desarrollo de títulos de anticuerpos. detrás de la enfermedad clínica (Eberts et al., 2011).

2.2.9 Tratamiento y prevención

El tratamiento de elección para la AGC es la doxiciclina (5 mg / kg PO c/12h durante 2 semanas). La mayoría de los perros muestran una mejoría clínica dentro de las 24 a 48 horas del tratamiento antibiótico inicial. A pesar de las contraindicaciones médicas un estudio documentó que dos de ocho perros infectados requirieron hasta seis días de tratamiento con tetraciclina para la resolución completa de los signos clínicos (Poitout et al., 2005).

La infección se puede prevenir evityo que las garrapatas se adhieran al anfitrión, y la pronta eliminación de las garrapatas. Se ha demostrado que las combinaciones de imidacloprid, permetrina, fipronilo y metoprenado previenen la transmisión de *A. phagocytophilum* a perros de garrapatas infectadas hasta 25 días después del tratamiento inicial (Blagburn et al., 2004).

La reinfección no se ha reportado en perros. En la literatura humana, la reinfección se ha documentado en un paciente (Horowitz et al., 1998).

Se ha demostrado que los caballos resisten la reinfección después de la recuperación de la infección inicial con *A. phagocytophilum*. La infección natural puede conferir protección a largo plazo contra el desarrollo de nuevas infecciones (Carrade et al., 2009).

3. Planteamiento del problema

a) Pregunta de investigación

¿Cuál es la prevalencia de *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp* y los factores asociados a estas infecciones en perros de la subregión centro de Tabasco?

b) Justificación

El clima tropical de Tabasco, es un entorno favorable para la proliferación de garrapatas, dentro de ellas *Rhipicephalus sanguineus*, considerada la principal especie vector de *Ehrlichia spp* Y *Anaplasma spp*. Estas infecciones afectan la salud de los perros ya que ocasionan fiebre, anemia, depresión, anorexia, trombocitopenia, así como daño a diversos órganos como hígado, bazo y nodulos linfáticos, e inclusive ocasionarles la muerte (Medrano-Bugarini et al., 2019). No obstante estas infecciones pueden también ser transmitidas a las personas, ocasionando infecciones graves que ponen en riesgo la vida de las personas, por lo que son consideradas un problema de salud pública (Alcántara-Rodríguez et al., 2020). Determinar la prevalencia y factores asociados a las infecciones en perros domésticos puede contribuir a generar medidas de intervención que disminuyan la presencia de estas infecciones, contribuyendo así a mejorar la salud de los caninos y salvaguardar la salud pública.

c) Objetivo general y objetivos específicos

Objetivo general:

- Determinar la prevalencia y los factores asociados a la infección de bacterias del género *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp* en perros con dueño de la subregión Centro, Tabasco, México.

Objetivos específicos:

- Identificar molecularmente las especies de *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp* que infectan la sangre de perros con dueño de la subregión, Centro, Tabasco.
- Determinar la prevalencia de *Ehrlichia spp* Y *Anaplasma spp* en los perros estudiados.
- Identificar los factores asociados a la infección de *Ehrlichia spp* Y *Anaplasma spp* en perros con dueño de la de la subregión, Centro, Tabasco.

4. Materiales y métodos

4.1 Área de estudio:

El presente estudio se llevó a cabo en la Subregión Centro del estado de Tabasco, ubicada a 17° 99' latitud Norte y 92° 95' longitud oeste. En la Subregión Centro se incluye la ciudad de Villahermosa capital del estado de Tabasco, en el sureste de México. La temperatura anual promedio es de 26°C y presenta precipitación pluvial todo el año (INEGI, 2020).

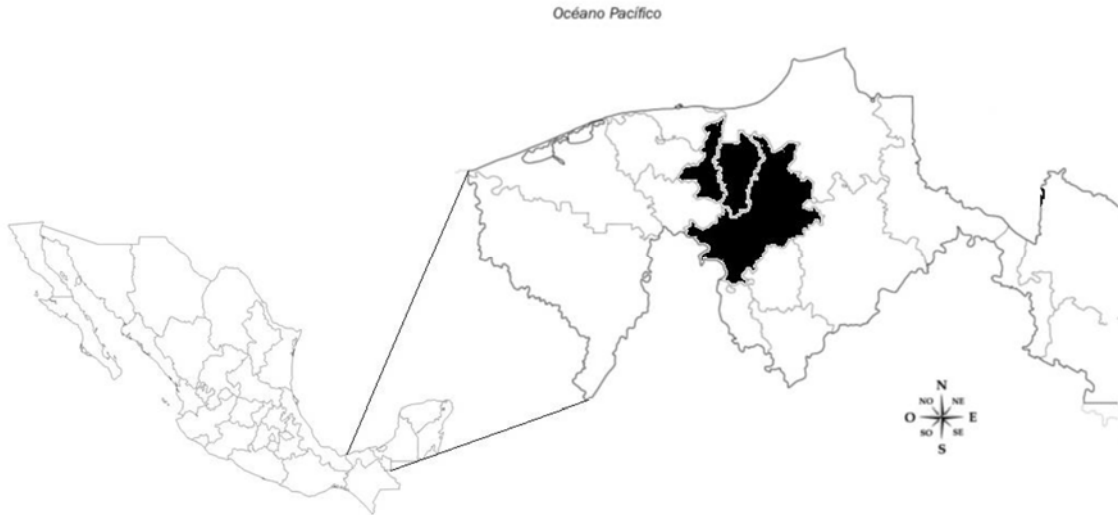


Ilustración 2 Ubicación geográfica de la subregión Centro en el estado de Tabasco (elaboración propia).

El presente estudio es de diseño observacional, descriptivo, progresivo y transversal. Se contemplaron criterios de inclusión y exclusión:

a) Criterios de inclusión:

- Perros con dueño de más de 3 meses de edad y 1.5 kg de peso, sexo indistinto y de cualquier condición corporal (1-9), con o sin presencia de ectoparásitos, de la subregión Centro del estado de Tabasco.

b) Criterios de exclusión:

- Perros cuyo manejo sea difícil.
- Perros menores de 3 meses de edad.
- Perros sin dueño.
- Perros menores de 1.5 kg de peso cuya recolección de la muestra sea de difícil acceso o que afecte la salud y el bienestar del paciente.

4.2 Tamaño de la muestra

El tipo de muestreo empleado fue un muestreo estratificado con asignación proporcional. Para determinar el tamaño de muestra de la población canina se utilizó el Censo Canino 2014 (único disponible en la SSA del estado de Tabasco) en el cual se contempla una población total 261,930 perros. Se utilizó una prevalencia esperada del 50% debido que se desconoce este dato en el lugar de estudio y este valor se consideró el más conservador, indicio que existe la misma posibilidad de encontrar o no el objeto de estudio en la población. Se utilizó la fórmula para determinación del tamaño de muestra en poblaciones finitas y conocidas de acuerdo con (Murray y Larry, 2020). Sustituyendo los valores se obtuvo una población de 1,302 perros para todo el estado. Mediante una asignación proporcional se obtuvo que para la subregión del Centro se requiere muestrear un total de 332 perros.

4.3 Toma de la muestra de sangre para la identificación de *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.*

Las muestras de sangre de los perros se obtuvieron de la vena cefálica utilizando aguja Vacutainer® y se depositaron en tubos de 4 ml con EDTA. Posteriormente, las muestras fueron identificadas utilizando números consecutivos y se conservaron en refrigeración durante su transporte al Laboratorio de Investigación de Enfermedades Tropicales y Transmitidas por Vectores de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en donde se almacenaron a - 20 °C hasta su procesamiento.

4.4 Extracción de ADN genómico para la identificación de *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.*

Para llevar a cabo la extracción 100 µl de sangre anti-coagulada se resuspendieron en 180 µl de solución de lisis de eritrocitos (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Triton X - 100 al 1% y sacarosa al 11%), la mezcla se incubó cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 18, 000 x g cinco minutos y se decantó el sobrenadante, este paso fue repetido tres veces para lisar por completo células sanguíneas y eliminar la hemoglobina.

Después, 60 µl de solución de lisis de leucocitos (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 400 mM y EDTA 2 mM), 10 µl de solución de proteinasa K (proteinasa K 1 mg / ml, SDS al 1% y EDTA 2 mM) y 2 µl de SDS al 20 % fueron añadidos a la muestra. La mezcla se incubó a 65°C por una hora. Posteriormente, se adicionaron 30 µl de acetato de potasio y se incubaron en hielo húmedo durante 30 minutos. Terminada la incubación, la mezcla fue centrifugada a 18, 000 x g quince minutos y el

sobrenadante se recuperó y se colocó en un nuevo tubo de serología (Eppendorf® de 1.5 ml). Posteriormente, se agregaron 200 µl de isopropanol absoluto y se dejó precipitar el ADN durante toda la noche.

Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 18, 000 x g durante 15 minutos y se descartó el isopropanol sobrenadante. Después se adicionaron 200 µl de etanol al 70% y posteriormente, la muestra fué centrifugada a 18, 000 x g y el etanol desechado. El ADN obtenido se secó durante 30 minutos y posteriormente, se resuspendió usando 50 µl de solución de TE (10 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 8.0).

4.5 Cebadores y reacción de PCR para identificar *Ehrlichia* spp. en ADN genómico procedente de sangre de perros

Para determinar la presencia de bacterias del género *Ehrlichia spp.* en ADN genómico procedente de la sangre de los perros muestreados se utilizaron un par cebadores generales para detectar el género *Ehrlichia spp.* Posteriormente, se realizó una segunda PCR utilizando cebadores específicos para identificar *E. canis*. El nombre de los cebadores, su secuencia, el sitio de origen, la masa molecular de sus productos de PCR y su reacción de PCR pueden ser observados en el Cuadro 1. La cantidad total de ADN de cada muestra extraída fue cuantificada empleando un NanoDrop (ThermoFisher Scientific, USA) y posteriormente homogenizada a una concentración de 100 ng/µl para ser usada en la PCR.

Tabla 1 Datos generales de los cebadores y las reacciones de PCR empleados para realizar el diagnóstico de *Ehrlichia* spp. en los perros muestreados.

Especie	Cebador	Secuencia	Origen	Producto	Reacción de PCR
<i>Ehrlichia a spp.</i>	EHR16S D	Forward: 5'GGTACCYACAGAAGAAGTCC 3'	16 s rRNA	345 pb	Desnaturalización : 95°C x 5 min 35 ciclos de: 94°C x 30s 55°C x 30s 72°C x 90s Extensión final: 72°C x 5 min
	EHR16S R	Reverse: 5'TAGCACTCATCGTTTACAGC3'			
<i>Ehrlichia a canis</i>	CANIS	Forward: 5'CAA-TTA-TTT-ATA-GCC-TCT- GGC-TAT-AGG-A 3'	16 s rRNA	409 pb	Desnaturalización : 95°C x 5 min 40 ciclos de: 95°C x 30s 60°C x 30s 72°C x 90s Extensión final: 72°C x 5 min
	GA1R	Reverse: 5'GAG-TTT-GCC-GGG-ACT-TCT- TCT3'			

(Nazari et al., 2013).

4.6 Cebadores y reacción de PCR para identificar *Anaplasma phagocytophilum* en ADN genómico procedente de sangre de perros

Se utilizaron dos diferentes pares de cebadores uno para la identificación de género (E1, E2) creados partir de una región conservada del gen 16 s rRNA y el segundo par de cebadores para la identificación de especie (MSP465f y MSP980r) originado de una región conservada del gen Msp2.

En la tabla 2 se observan los cebadores a utilizar, el gen de origen, la secuencia de cada cebador el microorganismo de la cual fue obtenida la secuencia y el tamaño de ampliación esperado.

Tabla 2 Cebadores a utilizar durante el presente estudio.

Gen	Primer	Secuencia	Microorganismo	Amplicon
16 s rRNA	E1	GGC ATG TAG GCG GTT CGG TAA GTT-	<i>Phagocitophylla</i> genogroup	262pb
	E2	CCC CAC ATT CAG CAC TCA TCG TTT A-		
Msp2	MSP465f	Forward: 5' TGATGTTGTTACTGGACAGA 3'	<i>Anaplasma</i> <i>phagocytophillum</i>	550pb
	MSP980r	Reverse: 5' CACCTAACCTTCATAAGAA 3'		

(Caspersen et al., 2002).

4.7 Determinación de la prevalencia de Ehrlichia y Anaplasma spp. en los perros muestreados.

Para determinar la prevalencia de perros infectados por *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.* se aplicó la fórmula general de prevalencia:

$$P_t = \frac{C_t}{N_t}$$

Donde P_t es la prevalencia estimada en el tiempo justo que se realizara el estudio, C_t es el número total de casos que resulten positivos durante ese período y N_t es el número total de individuos estudiados durante ese período de tiempo.

4.8 Análisis estadístico para identificar factores asociados a la infección de *E. canis* y *A. phagocytophilum* en los perros muestreados.

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa IBM SPSS versión 22[®] (IBM Corporation, Armonk, NY). Con las variables consideradas posibles factores asociados a la infección de *A. phagocytophilum* en perros, se realizó un modelo de regresión logística binomial, para explicar la presencia o ausencia de perros infectados. Para seleccionar las variables a incluir en el modelo, inicialmente se realizaría un análisis de regresión logística univariada, para explorar la posible asociación entre cada una de las variables independientes y la presencia o ausencia de infecciones en los perros. Se considerarían significativas aquellas con valor de $P < 0.05$.

Una vez seleccionadas las variables independientes se realizan diversos ensayos para elegir el método de entrada al programa estadístico (IBM SPSS versión 22) que más se adecue. El nivel de confianza sérica del 95%, se calcularon los Odds Ratio y se consideraron significativos los valores de $P < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Resultados *Ehrlichia spp.*

Se muestrearon un total de 223 perros en la subregión Centro del estado de Tabasco. Los resultados de la PCR para *A. phagocytophilum* fueron todos negativos. Con relación a *E. canis* se registró una prevalencia de 8.52% (19/223). Las variables estudiadas fueron dicotomizadas y analizadas mediante Regresión Logística Univariada. Los resultados mostraron una asociación de las variables condición corporal (< 3) y la procedencia del perro (rural), como puede observarse en el Cuadro 3. Las demás variables evaluadas no presentaron significancia ($P < 0.05$) en el análisis univariado, por lo que el desarrollo de un análisis multivariado no fue posible.

Tabla 3 Predicción de variables asociadas a la infección de *Ehrlichia canis* mediante regresión logística univariada.

Variables	B	EE	Wald	GL	OR	Valor de P	IC al 95%
Raza (No pura vs pura)	0.79	0.48	2.69	1	2.22	0.1	0.85-5.76
CC (<3 vs >3)	1.58	0.49	10.25	1	4.85	0.01*	1.84-12.76
Edad (<2 vs >2)	0.50	0.48	1.09	1	1.65	0.29	0.64-4.24
Procedencia (Rural vs urbano)	1.08	0.49	4.72	1	2.94	0.03*	1.11-7.8
Actividad (Dentro vs fuera)	0.66	0.67	0.95	1	1.93	0.32	0.51-7.28
Género (Macho vs hembra)	0.20	0.48	0.17	1	1.22	0.67	0.47-3.16
Talla (Grande vs chico)	0.71	0.54	1.74	1	2.04	0.18	0.70-5.88
Pelaje (Corto vs largo)	0.26	0.77	0.11	1	1.29	0.73	0.28-5.92
Color (Oscuro vs claro)	-0.72	0.48	0.22	1	0.93	0.88	0.36-2.38
Veterinario (No vs si)	0.55	0.48	1.29	1	1.74	0.25	0.66-4.55
Desparasitaciones (No vs si)	1.06	0.53	3.98	1	2.90	0.46	1.01-8.26
Garrapatas (si vs no)	0.99	0.53	3.37	1	2.69	0.06	0.93-7.75
Dormitorio (Fuera vs dentro)	2.01	1.03	3.76	1	7.5	0.05	0.97-57.45
Casa (Madera vs concreto)	0.25	0.66	0.14	1	1.28	0.70	0.35-4.71
Basura (si vs no)	-0.16	0.51	0.10	1	0.84	0.74	0.30-2.32

B: Coeficiente de regresión, EE: Error estándar, Wald: Estadístico de Wald, GL: Grados de libertad, OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza. * Variables con valor de $P < 0.05$

6. Discusión

E. canis y *A. phagocytophilum* son reconocidas bacterias que afectan la salud de perros alrededor del mundo. En el presente estudio no se encontraron perros positivos a la infección de *A. phagocytophilum* y la prevalencia de *E. canis* fue baja comparada con otros reportes en Costa Rica, Pakistán, Brazil y el Caribe (Wei et al., 2014; Malik et al., 2018; Paulino et al., 2018; Alhassan et al., 2021).

En comunidades rurales de Yucatán, en México la prevalencia de *E. canis* ha sido mayor (29.26%) a lo reportada en el presente estudio. Sin embargo, tampoco encontraron evidencia molecular de infecciones de *A. phagocytophilum* en los perros estudiados (Ojeda-Chi et al., 2019).

En el presente estudio la falta de asociación estadística entre la variable independiente presencia de garrapatas y la variable dependiente, positivo a la infección de *E. canis* puede deberse al hecho de que un alto porcentaje de perros 46.63% (104/223) presentaron infestaciones por garrapatas pero no presentaron la infección de la bacteria. Aunque no fue comprobado en el presente estudio, lo anterior puede ser debido a un bajo rango de infección en el vector. Este resultado también contrasta de lo obtenido en perros del estado de Yucatán en donde la infestación de garrapatas fue de 60% y la prevalencia de *E. canis* fue de 62% en la población canina estudiada (Díaz-Medina et al., 2016).

En general, las pruebas moleculares se han destacado por ser altamente específicas para detectar este tipo de patógenos al compararse con pruebas serológicas. Sin embargo, existe una gran cantidad de reportes de seroprevalencia de *E. canis* en perros de diferentes partes del mundo. Así, un estudio realizado en Perú reportó una seroprevalencia de 51.3% en perros infestados por la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus*. Dentro de los factores asociados a la infección por *E. canis*, el estudio reportó una pobre condición física, un elevado número de garrapatas y una mayor prevalencia en perros de edad adulta (Huerto-Medina y Damaso-Mata, 2015). La prevalencia reportada en Perú fue mayor la encontrada en el presente estudio. Sin embargo, es fácil notar que las poblaciones caninas estudiadas fueron diferentes, por lo que una comparación directa no sería razonable.

En Costa Rica se ha reportado una prevalencia de *E. canis* de 32% (Barrantes-González et al., 2016). Sin embargo, se ha discutido anteriormente que las pruebas serológicas son menos específicas que las pruebas de PCR debido a que detectan los anticuerpos circulantes que permanecen semanas después de haber adquirido e incluso eliminado la infección.

En contra parte, estudios moleculares y recientes han reportado baja prevalencia molecular de infecciones tanto de *Anaplasma spp* como de *Ehrlichia spp*, similar a la encontrada en el presente estudio. Así, un amplio estudio de diagnóstico molecular llevado a cabo en Texas, EE. UU. Reportó una prevalencia de 5.78% para *E. canis* y *A. platys* (Modarelli et al., 2019). Similarmente, en Paraguay se reportó una prevalencia molecular de 10.41% para estos mismos patógenos (Pérez-Macchi et al., 2019), mientras que en Colombia se reportó una prevalencia molecular de 13% en perros de zonas pertenecientes a zonas urbanas (Gallego et al., 2023). Otro estudio realizado en 100 perros de La Comarca Lagunera, entre los estados del norte de Coahuila y Durango en México se reportó una prevalencia de *E. canis* de 10%, la cual es similar a la reportada en el presente estudio (Almazán et al., 2016). Estos estudios tienen en común al presente estudio que la población canina perteneció principalmente a zonas urbanas, todos fueron perros con dueño, la obtención de las muestras fue al azar y el diagnóstico se realizó mediante PCR, por lo que esta discusión resalta la importancia de la comparación con estudios en donde las poblaciones, técnicas e incluso la fecha en que se realizan los estudios sean similares.

De las variables estudiadas en el presente trabajo, dos variables fueron significativamente asociadas a la infección: condición corporal <3 y pertenecer a una zona rural. Los estudios recientes indican que las variables: edad avanzada, no tener un tratamiento ectoparasitario, y pertenecer a una población con estrato socioeconómico bajo se asocian significativamente a la infección de *E. canis* (Modarelli et al., 2019; Gallego et al., 2023). Sin embargo, no debe perderse la visión clínica general de la población canina estudiada ya que en este estudio no se descarta la posibilidad de otras infecciones concomitantes o causadas por otros ectoparásitos diferentes a garrapatas, parásitos gastrointestinales u otras variables inherentes al manejo de los perros, no consideradas en el presente estudio. El medio rural se encuentra influenciado por otros factores como son la falta de servicios veterinarios (comparado con el medio urbano), el estatus económico de la población en estas zonas muchas veces es limitado, lo cual, no permite

la adquisición de alimentos de buena calidad para sus mascotas, el uso de fármacos para controlar las infestaciones de endo y ectoparásitos, y en general, se carece de una cultura enfocada al cuidado de la salud y bienestar de las mascotas.

7. Conclusiones

No se encontró evidencia molecular de *A. phagocytophilum* en la población canina estudiada. La prevalencia molecular de *E. canis* fue de 8.52% y los factores asociados a la infección fueron una condición corporal menor a 3 y pertenecer a una zona rural. Incrementar el número de muestras e identificar infecciones concomitantes podría mejorar la identificación de factores asociados a la infección de *E. canis*.

8. Referencias

- Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M.F., Sparagano, O., Parpaglia, M.L.P., Cubeddu, T., Pintori, G., Pittau, M., 2005. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6418–6422.
- Alcántara-Rodríguez, V.E., Sánchez-Montes, S., Contreras, H., Colunga-Salas, P., Fierro-Flores, L., Avalos, S., Rodríguez-Rangel, F., Becker, I., Walker, D.H., 2020. Human Monocytic Ehrlichiosis, Mexico City, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 3016.
- Alhassan, A., Hove, P., Sharma, B., Matthew-Belmar, V., Karasek, I., Lanza-Perea, M., Werners, A.H., Wilkerson, M.J., Ganta, R.R., 2021. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the Caribbean. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 12, 101727. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101727>
- Almazán, C., González-Álvarez, V.H., Fernández de Mera, I.G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., de la Fuente, J., 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 276–283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>
- Ansari-Mood, M., Khoshnegah, J., Mohri, M., Rajaei, S., 2015. Seroprevalence and Risk Factors of *Ehrlichia canis* Infection among Companion Dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009–2010. *J. Arthropod. Borne. Dis.* 9.
- Atif, F.A., 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 114, 3941–3957.
- Bahrami, S., Hamidinejat, H., Tafreshi, A.R.G., 2018. FIRST MOLECULAR DETECTION OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* IN DROMEDARIES (*CAMELUS DROMEDARIUS*). *J. Zoo Wildl. Med.* 49, 844–848. <https://doi.org/10.1638/2017-0165.1>
- Baldrige, G.D., Scoles, G., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2009. Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 46, 625–632.

- Barrantes-González, A. V, Jiménez-Rocha, A.E., Romero-Zuñiga, J.J., Dolz, G., 2016. Serology, molecular detection and risk factors of Ehrlichia canis infection in dogs in Costa Rica. Ticks Tick. Borne. Dis. 7, 1245–1251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.006>
- Beall, M.J., Alleman, A.R., Breitschwerdt, E.B., Cohn, L.A., Couto, C.G., Dryden, M.W., Guptill, L.C., Iazbik, C., Kania, S.A., Lathan, P., Little, S.E., Roy, A., Sayler, K.A., Stillman, B.A., Welles, E.G., Wolfson, W., Yabsley, M.J., 2012. Seroprevalence of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia ewingii in dogs in North America. Parasit. Vectors 5, 29. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-29>
- Berzina, I., Capligina, V., Bormane, A., Pavulina, A., Baumanis, V., Ranka, R., Granta, R., Matisē, I., 2013. Association between Anaplasma phagocytophilum seroprevalence in dogs and distribution of Ixodes ricinus and Ixodes persulcatus ticks in Latvia. Ticks Tick. Borne. Dis. 4, 83–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.08.003>
- Bexfield, N.H., Villiers, E.J., Herrtage, M.E., 2005. Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with Anaplasma phagocytophilum in a dog. J. Small Anim. Pract. 46, 543–548.
- Blagburn, B.L., Spencer, J.A., Billeter, S.A., Drazenovich, N.L., Butler, J.M., Land, T.M., Dykstra, C.C., Stafford, K.C., Pough, M.B., Levy, S.A., Bledsoe, D.L., 2004. Use of imidacloprid-permethrin to prevent transmission of Anaplasma phagocytophilum from naturally infected Ixodes scapularis ticks to dogs. Vet. Ther. 5, 212–217.
- Borthakur, S.K., K. Deka, D., Bhattacharjee, K., C. Sarmah, P., 2014. Seroprevalence of canine dirofilariosis, granulocytic anaplasmosis and lyme borreliosis of public health importance in dogs from India's North East. Vet. World 7, 665–667. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.665-667>
- Bowman, D.D., 2011. Georgis Parasitologia para veterinarios, Novena edi. ed. Elsevier, Barcelona, España.
- Buller, R.S., Arens, M., Hmiel, S.P., Paddock, C.D., Sumner, J.W., Rikihisa, Y., Unver, A., Gaudreault-Keener, M., Manian, F.A., Liddell, A.M., Schmulewitz, N., Storch, G.A., 1999. Ehrlichia ewingii, a Newly Recognized Agent of Human Ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. 341, 148–155. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907153410303>

- Cao, W.C., Zhao, Q.M., Zhang, P.H., Dumler, J.S., Zhang, X.T., Fang, L.Q., Yang, H., 2000. Granulocytic Ehrlichiae in Ixodes persulcatus ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4208–4210.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L., Sykes, J.E., 2009. Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 1129–1141. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x>
- Caspersen, K., Park, J.-H., Patil, S., Dumler, J.S., 2002. Genetic Variability and Stability of *Anaplasma phagocytophila* msp2 (p44). *Infect. Immun.* 70, 1230–1234. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1230-1234.2002>
- Chapman, A.S., Bakken, J.S., Folk, S.M., Paddock, C.D., Bloch, K.C., Krusell, A., Sexton, D.J., Buckingham, S.C., Marshall, G.S., Storch, G.A., Dasch, G.A., McQuiston, J.H., Swerdlow, D.L., Dumler, S.J., Nicholson, W.L., Walker, D.H., Eremeeva, M.E., Ohl, C.A., 2006. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR. Recomm. reports Morb. Mortal. Wkly. report. Recomm. reports* 55, 1–27.
- Chen, S.M., Dumler, J.S., Bakken, J.S., Walker, D.H., 1994. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32, 589–595.
- Chirek, A., Silaghi, C., Pfister, K., Kohn, B., 2017. Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. *J. Small Anim. Pract.* 59, 112–120. <https://doi.org/10.1111/jsap.12787>
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D., 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>
- Díaz-Medina, O.C., Bolio-González, M.E., Rodríguez-Vivas, R.I., Gutiérrez-Ruiz, E.J., Pérez-Osorio, C., 2016. Molecular survey of Ehrlichia canis in dogs from Mexico: prevalence of infection and possible associated factors . *Ecosistemas y Recur. Agropecu.* .
- Dolz, G., Leyda, Á., E, R.L., Liliana, C.-C., Laura, B.-M., Ana, J.-R., 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Med. Costarric.* 55, 34–40.

- Dubie, T., Mohammed, Y., Terefe, G., Muktar, Y., Tesfaye, J., 2014. An insight review on canine ehrlichiosis with emphasis on its epidemiology and pathogenesis importance. *Glob. J. Vet. Med. Res.* 2, 59–67.
- Dumler, J.S., 2013. Conferencias Magistrales Ehrlichiosis y anaplasmosis humanas en América (Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis in America). *Acta Med. Costarric.* 55, 29–33.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.
- Eberts, M.D., Vissotto de Paiva Diniz, P.P., Beall, M.J., Stillman, B.A., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E.B., 2011. Typical and atypical manifestations of Anaplasma phagocytophilum infection in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47, e86-94.
<https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5578>
- Echeverry, P.D., Ríos Osorio, L., 2016. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Cienc. Y Tecnol. Agropecu.* 17(1), 81–95.
https://doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463
- Eiras, D.F., Craviotto, M.B., Vezzani, D., Eyal, O., Baneth, G., 2013. First description of natural Ehrlichia canis and Anaplasma platys infections in dogs from Argentina. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 169–173.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.008>
- Engvall, E.O., Pettersson, B., Persson, M., Artursson, K., Johansson, K.E., 1996. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic Ehrlichia species in dogs, horses, and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2170–2174.
- Esemu, S.N., Ndip, L.M., Ndip, R.N., 2011. Ehrlichia species, probable emerging human pathogens in sub-Saharan Africa: environmental exacerbation 26, 269–279.
<https://doi.org/doi:10.1515/REVEH.2011.034>
- Ferrolho, J., Simpson, J., Hawes, P., Zwegarth, E., Bell-Sakyi, L., 2016. Growth of Ehrlichia

- canis, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 631–637.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.013>
- Foggie, A., 2018. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 1–15. <https://doi.org/10.1002/path.1700630103>
- Fourie, J.J., Stanneck, D., Luus, H.G., Beugnet, F., Wijnveld, M., Jongejan, F., 2013. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet. Parasitol.* 197, 595–603.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.026>
- Galemore, E.R., Labato, M.A., O’Neil, E., 2018. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in feral cats in Massachusetts. *J. Feline Med. Surg. Open Reports* 4, 2055116917753804.
- Gallego, M.M., Triana-Chávez, O., Mejia-Jaramillo, A.M., Jaimes-Dueñez, J., 2023. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* reveals multiple genogroups associated with clinical traits in dogs from urban areas of Colombia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 14, 102111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102111>
- Günaydin, E., Pekkaya, S., Kuzugüden, F., Zeybek, M., Güven G, T., Ütük, A.E., 2018. Türkiye’de Atlarda anti-*Anaplasma phagocytophilum* Antikorlarının İlk Tespiti. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 24, 867–871. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20171>
- Han, D.-G., Ryu, J.-H., Chae, J.-B., Kim, D.-W., Kwon, C.-H., Choi, K.-S., 2018. First report of *Anaplasma phagocytophilum* infection in Holstein cattle in the Republic of Korea. *Acta Trop.* 183, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.014>
- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., Cornelissen, A.W.C.A., 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2745–2749.
- Horowitz, H.W., Aguero-Rosenfeld, M., Dumler, J.S., McKenna, D.F., Hsieh, T.C., Wu, J., Schwartz, I., Wormser, G.P., 1998. Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Ann. Intern. Med.* 129, 461–463.

- Huerto-Medina, E., Damaso-Mata, B., 2015. Factores asociados a la infección por *Ehrlichia canis* en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 32, 756–760.
- INEGI, 2020. Instituto Nacional de Estadística y Geografía-INEGI, Mexico. [WWW Document].
- Jäderlund, K.H., Egenvall, A., Bergström, K., Hedhammar, Å., 2007. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *Vet. Rec.* 160, 825–831.
- Johnson, D.H., Schiffman, E., Davis, J., Neitzel, D., Sloan, L., Nicholson, W., Fritsche, T., Steward, C., Ray, J., Miller, T., Feist, M., Uphoff, T., Franson, J., Livermore, A., Deedon, A., Theel, E., Pritt, B., 2015. Human Infection with *Ehrlichia muris*-like Pathogen, United States, 2007–2013. *Emerg. Infect. Dis. J.* 21, 1794.
<https://doi.org/10.3201/eid2110.150143>
- Kemperman, M., D, N., Jensen K, et al., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion--Minnesota, 2007. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 57, 1145–1148.
- Kirtz, G., Czettel, B., Thum, D., Leidinger, E., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in einer österreichischen Hundepopulation: eine Prävalenz-Studie (2001–2006). *Kleintierpraxis* 7, 562–568.
- Lai, T.-H., Kumagai, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Rikihisa, Y., 2009. The *Anaplasma phagocytophilum* PleC Histidine Kinase and PleD Diguanylate Cyclase Two-Component System and Role of Cyclic Di-GMP in Host Cell Infection. *J. Bacteriol.* 191, 693–700.
<https://doi.org/10.1128/JB.01218-08>
- Little, S.E., Beall, M.J., Bowman, D.D., Chandrashekar, R., Stamaris, J., 2014. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010–2012. *Parasit. Vectors* 7, 257. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-257>
- Macleod, J., Gordon, W.S., 1933. Studies in Tick-borne Fever of Sheep. I. Transmission by the Tick, *Ixodes ricinus*, with a Description of the Disease Produced. *Parasitology* 25, 273–283.
<https://doi.org/DOI: 10.1017/S0031182000019442>
- Madewell, B., Gribble, D., 1982. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J*

- Am Vet Med Assoc 180, 512–514.
- Madigan, J.E., Gribble, D., 1987. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 445–448.
- Magnarelli, L.A., Litwin, H.J., Holland, C.J., Anderson, J.F., Ristic, M., 1990. Canine ehrlichiosis in Connecticut. J. Clin. Microbiol. 28, 366–367. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.366-367.1990>
- Malik, M.I., Qamar, M., Ain, Q., Hussain, M.F., Dahmani, M., Ayaz, M., Mahmood, A.K., Davoust, B., Shaikh, R.S., Iqbal, F., 2018. Molecular detection of Ehrlichia canis in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). Vet. Med. Sci. 4, 126–132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/vms3.94>
- Martin, G.S., Christman, B.W., Standaert, S.M., 1999. Rapidly Fatal Infection with Ehrlichia chaffeensis. N. Engl. J. Med. 341, 763–764. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411014>
- McBride, J.W., Walker, D.H., 2011. Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. Expert Rev. Mol. Med. 13, e3. <https://doi.org/DOI:10.1017/S1462399410001730>
- Medrano-Bugarini, R.A., Figueroa-Millán, J.V., Rivera-Chavira, B.E., Lira-Amaya, J.J., Rodríguez-Alarcón, C.A., Beristain-Ruiz, D.M., Adame-Gallegos, J.R., 2019. Detection of Theileria equi, Babesia caballi, and Anaplasma phagocytophilum DNA in Soft Ticks and Horses at Ciudad Juarez, Mexico. Southwest. Entomol. 44, 647–658. <https://doi.org/10.3958/059.044.0310>
- Modarelli, J.J., Tomeček, J.M., Piccione, J., Ferro, P.J., Esteve-Gasent, M.D., 2019. Molecular prevalence and ecoregion distribution of select tick-borne pathogens in Texas dogs. Transbound. Emerg. Dis. 66, 1291–1300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tbed.13145>
- Movilla, R., Garcia, C., Siebert, S., Roura, X., 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi (sensu lato), Dirofilaria immitis and Ehrlichia canis in Mexico. Parasit. Vectors 9, 421. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1686-z>

- Muhanguzi, D., Ikwap, K., Picozzi, K., Waiswa, C., 2010. Molecular characterization of anaplasma and ehrlichia species in different cattle breeds and Age groups in mbarara district (Western Uganda). *Int. J. Anim. Vet. Adv.* 2, 76–88.
- Munderloh, U.G., Lynch, M.J., Herron, M.J., Palmer, A.T., Kurtti, T.J., Nelson, R.D., Goodman, J.L., 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 101, 53–64.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.011>
- Nazari, M., Lim, S.Y., Watanabe, Mahira, Sharma, R.S.K., Cheng, N.A.B.Y., Watanabe, Malaika, 2013. Molecular Detection of *Ehrlichia canis* in Dogs in Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e1982.
- Nyarko, E., Grab, D.J., Dumler, J.S., 2006. *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils enhance transmigration of *Borrelia burgdorferi* across the human blood brain barrier in vitro. *Int. J. Parasitol.* 36, 601–605. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.01.014>
- Ogaz-Campos, A.C., 2015. Frecuencia de ehrlichiosis monocítica y anaplasmosis granulocítica humana y sus características clínico-epidemiológicas en pacientes pediátricos atendidos en el IMSS del 2010 a 2014. Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Ogden, N.H., Woldehiwet, Z., Hart, C.A., 1998. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J. Med. Microbiol.* 47, 475–482.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00222615-47-6-475>
- Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Naitou, H., Hiroi, M., Masuzawa, T., 2005. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1780–1783. <https://doi.org/10.3201/eid1111.050407>
- Ojeda-Chi, M.M., Rodriguez-Vivas, R.I., Esteve-Gasent, M.D., Pérez de León, A.A., Modarelli, J.J., Villegas-Perez, S.L., 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 67, 101351.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>
- Padgett, K.A., Lane, R.S., 2001. Life cycle of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae): timing of developmental processes under field and laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 38, 684–

693.

- Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L., 2009. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. *Parasitol. Res.* 105, 101–114.
<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1501-2>
- Pantchev, N., Schnyder, M., Vrhovec, M.G., Al., E., 2015. Current surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in dogs in Bulgaria. *Parasitol. Res.* 114, 117–130.
- Paulino, P.G., Pires, M.S., da Silva, C.B., Peckle, M., da Costa, R.L., Vitari, G.V., Vilela, J.A.R., de Abreu, A.P.M., Massard, C.L., Santos, H.A., 2018. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 159, 135–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.012>
- Pennisi, M.-G., Capri, A., Solano-Gallego, L., Lombardo, G., Torina, A., Masucci, M., 2012. Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). *Ticks Tick. Borne. Dis.* 3, 315–318.
- Pérez-Macchi, S., Pedrozo, R., Bittencourt, P., Müller, A., 2019. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 31–39.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.015>
- Plier, M.L., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Kidd, L.B., 2009. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 45, 232–238. <https://doi.org/10.5326/0450232>
- Poitout, F.M., Shinozaki, J.K., Stockwell, P.J., Holland, C.J., Shukla, S.K., 2005. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J. Clin. Microbiol.* 43, 796 LP – 801. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.796-801.2005>

- Popov, V.L., Han, V.C., Chen, S.-M., Dumler, J.S., Feng, H.-M., Andreadis, T.G., Tesh, R.B., Walker, D.H., 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.* 47, 235–251.
- Prado-Ávila, S.R., Rascón-Cruz, Q., Beristain-Ruiz, D.M., Adame-Gallegos, J.R., 2018. Identificación del agente etiológico de la anaplasmosis granulocítica humana en la garrapata café de perro en Chihuahua, México. *Salud Publica Mex.* 60, 377–378.
- Rikihisa, Y., 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 469–489. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10>
- Rojas, N., Castillo, D., Marin, P., 2015. Molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* in humans, Costa Rica. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 532–534. <https://doi.org/10.3201/eid2103.131759>
- Rojero-Vázquez, E., Gordillo-Pérez, G., Weber, M., 2017. Infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. in Opossums and Dogs in Campeche, Mexico: The Role of Tick Infestation. *Front. Ecol. Evol.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00161>
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit. Vectors* 8, 75. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Salinas-Meléndez, J.A., Villavicencio-Pedraza, R., Tamez-Hernandez, B. V, Hernandez-Escareño, J.J., Avalos-Ramirez, R., Zarate-Ramos, J.J., Picón-Rubio, F.J., Riojas-Valdés, V.M., 2014. Prevalence of anti-*Anaplasma phagocytophilum* antibodies among dogs from Monterrey, Mexico. *African J. Microbiol. Res.* 8, 825–829.
- Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F., Dumler, J.S., 2009. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet. Rec.* 164, 168–171.
- Sarih, M., M’Ghirbi, Y., Bouattour, A., Gern, L., Baranton, G., Postic, D., 2005. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1127–1132.
- Scorpio, D.G., Dumler, J.S., Barat, N.C., Cook, J.A., Barat, C.E., Stillman, B.A., DeBisceglie,

- K.C., Beall, M.J., Chandrashekar, R., 2011. Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 223–229.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0262>
- Smith, R., Miodrag, R., L., H.D., A., B.R., 1975. Platelet Kinetics in Canine Ehrlichiosis: Evidence for Increased Platelet Destruction as the Cause of Thrombocytopenia. *Infect. Immun.* 11, 1216–1221. <https://doi.org/10.1128/iai.11.6.1216-1221.1975>
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E., 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet. Res.* 37, 231–244.
- Sosa-Gutierrez, C.G., Vargas-Sandoval, M., Torres, J., Gordillo-Pérez, G., 2016. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. *J. Vet. Sci.* 17, 353–360. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.3.353>
- Sosa-Gutiérrez, C.G., Vargas, M., Torres, J., Gordillo-Pérez, G., 2014. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. *Artic. J. Biomed. Sci. Eng.* 7, 884–889.
<https://doi.org/10.4236/jbise.2014.711087>
- Stuen, S., 2007. *Anaplasma Phagocytophilum* - the Most Widespread Tick-Borne Infection in Animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 31, 79–84. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0071-y>
- Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 31.
- Tate, C.M., Howerth, E.W., Mead, D.G., Dugan, V.G., Luttrell, M.P., Sahara, A.I., Munderloh, U.G., Davidson, W.R., Yabsley, M.J., 2013. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 110–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.09.005>
- Telford, S.R. 3rd, Dawson, J.E., Katavolos, P., Warner, C.K., Kolbert, C.P., Persing, D.H., 1996. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6209–6214.

- Teshale, S., Geysen, D., Ameni, G., Asfaw, Y., Berkvens, D., 2015. Improved molecular detection of Ehrlichia and Anaplasma species applied to Amblyomma ticks collected from cattle and sheep in Ethiopia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 1–7.
- Teshale, S., Geysen, D., Ameni, G., Dorny, P., Berkvens, D., 2018. Survey of Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma sp. “Omatjenne” infection in cattle in Africa with special reference to Ethiopia. *Parasit. Vectors* 11, 162. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2633-y>
- Troese, M.J., Kahlon, A., Ragland, S.A., Ottens, A.K., Ojogun, N., Nelson, K.T., Walker, N.J., Borjesson, D.L., Carlyon, J.A., 2011. Proteomic Analysis of Anaplasma phagocytophilum during Infection of Human Myeloid Cells Identifies a Protein That Is Pronouncedly Upregulated on the Infectious Dense-Cored Cell. *Infect. Immun.* 79, 4696 LP – 4707. <https://doi.org/10.1128/IAI.05658-11>
- Vargas-Hernández, G., André, M.R., Faria, J.L.M., Munhoz, T.D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R.Z., Tinucci-Costa, M., 2012. Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Vet. Parasitol.* 186, 254–260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
- Waladde, S.M., Young, A.S., Morzaria, S.P., 1996. Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitol. Today* 12, 272–278.
- Waner, T., Harrus, S., Weiss, D.J., Bark, H., Keysary, A., 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 177–182. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05420-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05420-B)
- Wei, L., Kelly, P., Ackerson, K., El-Mahallawy, H.S., 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, 21–25. <https://doi.org/doi:10.1515/ap-2015-0003>
- Woldehiwet, Z., 1983. Tick-borne fever: A review. *Vet. Res. Commun.* 6, 163–175. <https://doi.org/10.1007/BF02214910>
- Ybañez, A.P., Inokuma, H., 2016. Anaplasma species of veterinary importance in Japan. *Vet. World.* <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1190-1196>

Zhang, L., Liu, Y., Ni, D., Li, Q., Yu, Y., Yu, X., Wan, K., Li, D., Liang, G., Jiang, X., Jing, H., Run, J., Luan, M., Fu, X., Zhang, J., Yang, W., Wang, Y., Dumler, J.S., Feng, Z., Ren, J., Xu, J., 2008. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA* 300, 2263–2270. <https://doi.org/10.1001/jama.2008.626>

Zhi, N., Ohashi, N., Tajima, T., Mott, J., Stich, R.W., Grover, D., Telford, S.R., Lin, Q., Rikihisa, Y., 2002. Transcript heterogeneity of the p44 multigene family in a human granulocytic ehrlichiosis agent transmitted by ticks. *Infect. Immun.* 70, 1175–1184.