

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



Detección molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia spp.*, *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) con sospecha de hemoparásitos en clínicas veterinarias de Santa Tecla y San Salvador, El Salvador.

POR:

**Br. Miranda Tovar Rafael Eduardo
Br. Najarro Flores Roberto Antonio
Br. Navarrete Hernández Iván Vladimir**

CUIDAD UNIVERSITARIA, 2 DE FEBRERO DEL 2018.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**



Detección molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia spp.*, *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) con sospecha de hemoparásitos en clínicas veterinarias de Santa Tecla y San Salvador, El Salvador.

POR:

**Br. Miranda Tovar Rafael Eduardo
Br. Najarro Flores Roberto Antonio
Br. Navarrete Hernández Iván Vladimir**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.**

CIUDAD UNIVERSITARIA, 2 DE FEBRERO DEL 2018.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

LIC. ROGER ARMANDO ARIAS.

SECRETARIO GENERAL:

LIC. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS.

DECANO:

ING. AGR. M.Sc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA.

SECRETARIO:

ING. AGR. M. Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO.

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

F. _____
M.V.Z. ROSY FRANCIS ALVARENGA ARTIGA.

DOCENTE DIRECTOR

F. _____
M.V.Z. M.Sc. LUIS ERNESTO ROMERO PÉREZ

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION

F. _____
M.V.Z. MARIA JOSE VARGAS ARTIGA.

RESUMEN.

La investigación se realizó en diez clínicas veterinarias, pertenecientes a los departamentos de San Salvador y La Libertad, El Salvador, durante el período de mayo 2016 a marzo 2017 y consistió en la detección molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia spp* y *Ehrlichia canis* en 100 caninos con sospecha de hemoparásitos. El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue empleado en dos protocolos diferentes para la identificación de los tres agentes, a partir de una extracción de sangre de animales sintomáticos. Se evaluó la frecuencia de hemoparásitos individual y la presencia de co-infecciones, obteniéndose porcentajes relativamente altos: *Ehrlichia canis* 34%, *Anaplasma platys* 17% y *Babesia spp* 21%. A nivel Centroamericano existe un porcentaje significativo en la detección de hemoparásitos en perros que se asemeja mucho a los valores obtenidos en el país. Los resultados obtenidos para co-infecciones de dos agentes fueron: Anaplasma-Ehrlichia 4%, Babesia-Ehrlichia 4% y Anaplasma-Babesia 2%. En el caso de co-infecciones para tres agentes Anaplasma-Babesia-Ehrlichia se detectó la presencia de 1%. No fue posible la detección de *Hepatozoon canis* en ninguna muestra. Finalmente, se brindó al país una herramienta diagnóstica de utilidad para futuras investigaciones.

Palabras clave: Hemoparásitos, Perros, *Anaplasma platys*, *Babesia spp.*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, El Salvador, PCR.

ABSTRACT.

The research was carried out in ten veterinary clinics belonging to the departments of San Salvador and La Libertad, El Salvador, during the period from May 2016 to March 2017 and consisted in the molecular detection of *Anaplasma platys*, *Babesia spp.* and *Ehrlichia canis* in 100 dogs suspected to hemoparasites. The polymerase chain reaction (PCR) method was used in two different protocols for the identification of the three agents, from a blood extraction of symptomatic animals. The frequency of single hemoparasites and the presence of co-infections were evaluated, obtaining relatively high percentages: *Ehrlichia canis* 34%, *Anaplasma platys* 17% and *Babesia spp.* 21%. At the Central American level there is a significant percentage in the detection of hemoparasites in dogs that closely resembles the values obtained in the country. The results obtained for co-infections of two agents were: Anaplasma-Ehrlichia 4%, Babesia-Ehrlichia 4% and Anaplasma-Babesia 2%. In the case of co-infections for three agents Anaplasma-Babesia-Ehrlichia the presence of 1% was detected. It was not possible to detect *Hepatozoon canis* in any sample. Finally, a useful diagnostic tool for future research was provided to the country.

Key words: Hemoparasites, Dogs, *Anaplasma platys*, *Babesia spp.*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, El Salvador, PCR.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad de El Salvador por el aporte de conocimientos y por la formación profesional adquirida en los años de estudio.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por abrirnos las puertas y apoyarnos en la fase de laboratorio.

A las diez Clínicas Veterinarias por ayudarnos en la recolección de las 100 muestras de sangre, por su paciencia y tiempo otorgado.

Al Asesor Dr. Luis Romero por su valioso apoyo, tiempo, paciencia y dedicación; gracias por ser guía compartiendo su conocimiento y experiencia.

Al Dr. Marcelo Labruna por su colaboración en la realización de la Secuenciación de las muestras positivas enviadas a Brasil.

Agradecemos a la Dra. Delia Turcios y a URANO VET por el aporte de reactivos para la realización de la fase de laboratorio.

Finalmente, a todas las personas que colaboraron directa e indirectamente para la realización de esta investigación. ¡MUCHAS GRACIAS!

Rafael Miranda
Roberto Najarro
Iván Navarrete

Dedicatoria.

A Dios.

Por su amor y sabiduría que se necesitaba para terminar la carrera.

A mis ángeles en el cielo.

A mi Bella madre Ana Dolores Tobar y Elsa Aragón que soñaron tanto con este paso en mi vida.

A mi padre.

Ing. Agr. Jorge Rodolfo Miranda Gámez por todo su apoyo a lo largo de mi vida, te amo padre.

A mis hermanos.

Dr. Rodolfo Alberto Miranda y Elsa Guadalupe Miranda por su apoyo de forma directa e indirecta.

A mi amor Betty Manzanares.

Por todo tu amor, apoyo, comprensión y todos los ánimos que me diste a lo largo de toda mi carrera.

A toda mi familia.

Por todo el amor y apoyo que me brindaron a lo largo de toda mi vida y mi carrera.

A mis amigos.

Edgardo Barrientos, Carlo Martínez, Rodrigo Núñez, Dr. Víctor Tello, Dra. Violeta Paredes, Dra. Francis Alvarenga, Alexandra Ramírez, Gabriela de Martínez por todo su apoyo en esta etapa, gracias por recorrer cada paso conmigo, e aciertos y desaciertos.

A mis compañeros y amigos de tesis.

Iván Navarrete y Roberto Najarro, gracias por recorrer este camino juntos, al final se logró el objetivo.

Rafael Eduardo Miranda Tovar.

Dedicatoria.

A DIOS.

Por su infinita misericordia, amor y ayuda para terminar mi carrera y ser un profesional. El Señor es mi pastor; nada me falta en verdes praderas me hace descansar, a las aguas tranquilas me conduce, me da nuevas fuerzas y me lleva por caminos rectos, haciendo honor a su nombre. Aunque pase por el más oscuro de los valles, no temeré peligro alguno, porque tú, Señor, estás conmigo; tu vara y tu bastón me inspiran confianza. Me has preparado un banquete ante los ojos de mis enemigos; has vertido perfume en mi cabeza, y has llenado mi copa a rebosar. Tu bondad y tu amor me acompañan a lo largo de mis días, y en tu casa, oh Señor, por siempre viviré. Salmo23.

A MIS PADRES.

Roberto Martel y María Daysi Flores por su amor, dedicatoria, esfuerzo, enseñarme muchos valores, corregirme para ser un hombre de bien y por su incondicional apoyo desde un inicio para cumplir mi meta.

A MI NOVIA.

Georgina Flores quien con sus palabras de aliento y apoyo siempre me motivaron a seguir adelante, ser perseverante y cumplir con mis metas.

A MI HERMANA.

Daysi Najarro por su amor, comprensión y apoyo desde siempre.

A MI ABUELA Y ABUELO

Mamá Tita y Abuelo Ricardo por su amor, apoyo y sus consejos valiosos en mi vida.

A MIS MEJORES AMIGOS.

Por su apoyo incondicional y por su amistad.

A MIS COMPAÑEROS DE TESIS.

Iván Navarrete y Rafael Miranda por su amistad, por compartir sus conocimientos, por la unidad del grupo viviendo las mejores experiencias durante el proyecto, finalizando con el éxito esperado.

A MIS MAESTROS MEDICOS VETERINARIOS E ING. AGRONOMOS.

Por su apoyo, dedicatoria, amistad, comprensión y por ayudarme a salir adelante y ser un profesional.

Roberto Antonio Najarro Flores.

Dedicatoria

A Dios, por darme sabiduría, salud, y la fuerza para terminar mis estudios de Medicina Veterinaria y Zootecnia y darme la perseverancia de escribir y realizar mi tesis.

A mis padres Norma Laura e Iván Alcides que han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, brindarme los consejos, la confianza, los recursos y la oportunidad de lograrlo.

A mi hermana Laura Esmeralda Navarrete por su valioso ejemplo de dedicación y esfuerzo, sus enseñanzas, consejos, apoyo y compañía en todo momento de mi carrera.

A mi novia Jazmín Bolaños quien con sus palabras de aliento y apoyo siempre me motivaron a seguir adelante y ser perseverante y cumplir con mis ideales.

A toda mi familia por apoyarme en todo momento, desde el cielo mis abuelos Juanita y Napoleón guiando mis pasos, mis abuelos Margarita y Rubén, mis tías, Katy, Adís, Hedí, Ely, Ina, Vilma y Gloria que siempre han estado al pendiente de mí; tíos, Jorge, Walter y Gerardo, primos y sobrinos con su amor incondicional.

A todos mis profesores en la Facultad de Ciencias Agronómicas que me formaron a lo largo de este camino, doctor Luis Romero, asesor de tesis, Julio Figueroa por ser mi maestro y amigo, y todos los Médicos Veterinarios con los que comparto en la práctica diaria transformándome en un mejor profesional.

A mis compañeros de tesis, Roberto Najarro y Rafael Miranda, compartiendo su conocimiento, alegrías y buenos momentos a lo largo de la carrera y en el proceso de graduación convirtiéndonos en grandes amigos y futuros colegas.

A mis verdaderos amigos de toda la vida y a los que conocí a lo largo de todo este camino, compartiendo excelentes anécdotas y experiencias, aprendiendo de todos y cada uno de ellos, contando con su apoyo incondicional.

Iván Vladimir Navarrete Hernández

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Antecedentes.....	2
2.2 <i>ANAPLASMA SPP.</i>	2
2.2.1 <i>A. phagocytophilum</i>	3
2.2.2 <i>Anaplasma platys</i>	3
2.3 <i>BABESIA SPP.</i>	4
2.3.1 <i>Babesia canis</i>	5
2.3.2 <i>B. canis canis</i>	5
2.3.3 <i>B. canis rossi</i>	5
2.3.4 <i>Babesia gibsoni</i>	6
2.4 <i>EHRLICHIA SPP.</i>	6
2.4.1 <i>E. canis</i>	7
2.4.2 <i>Ehrlichia ewingii</i>	8
2.4.3 <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	8
2.5 <i>HEPATOZOON SPP.</i>	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	11
3.1 Descripción del estudio.....	11
3.1.1 <i>Ubicación geográfica.</i>	11
3.1.2 <i>Duración de la Investigación.</i>	11
3.2 Metodología de campo.....	11
3.2.1 <i>Características para la selección de las clínicas veterinarias.</i>	11
3.2.2 Selección de animales.....	12
3.3 Metodología de laboratorio.....	12
3.3.1 Extracción de ADN.....	12
3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	13
3.4 Metodología estadística.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	15
5. CONCLUSIONES	21
6. RECOMENDACIONES	22
7. BIBLIOGRAFIA.	23
8. ANEXOS	25

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje general de muestras incluyendo co-infecciones.....	16
Cuadro 2. Distribución de agentes, en infecciones simples y co-infecciones, en muestras positivas por las técnicas de PCR	17
Cuadro 3. Distribución de muestras positivas por veterinarias.	18
Cuadro 4. Comparación de resultados de seis muestras positivas por PCR en El Salvador y secuenciación en Brasil.....	19
Cuadro A- 1. Resultados obtenidos en clinicas veterinarias.	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje general de muestras incluyendo co-infecciones.....	16
Figura 2. Detalle de resultados de muestras positivas.....	17
Figura A- 1. Proceso de extracción de ADN de muestras sanguíneas de perros con el uso de Kit Comercial “High pure PCR template preparatio”	29
Figura A- 2. Proceso de amplificación por medio de PCR y elaboración de gel de electroforesis.	30
Figura A- 3. PCR para la detección de <i>Anaplasma platys</i>	30
Figura A- 4. PCR multiplex para la detección de <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia spp</i> y <i>Hepatozoon canis</i>	31

1. INTRODUCCIÓN

La sospecha de hemoparásitos en caninos es un problema de salud animal muy frecuente en las consultas veterinarias de El Salvador. Las enfermedades producidas por hemoparásitos pueden causar cuadros clínicos graves y en algunas ocasiones producen la muerte de las mascotas, por lo que resulta importante identificar las especies de parásitos que causan estas enfermedades, poniendo además de manifiesto su importancia en la salud humana.

Existen métodos directos e indirectos para determinar la presencia de hemoparásitos en caninos, pero en El Salvador, se ha realizado únicamente serología para ehrlichiosis y se reporta el hallazgo de mórulas compatibles con *Ehrlichia canis* en frotis sanguíneos; sin embargo, debido a los síntomas generales de la enfermedad, se asocia mucho a cualquier enfermedad febril con presencia de trastornos hematológicos.

Hasta la fecha en nuestro país no se han realizado estudios de detección de antígeno de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*. Estos agentes causantes de enfermedad en caninos pueden encontrarse incluso en co-infecciones que complican el cuadro clínico de un animal.

Una de las finalidades de la investigación, es proveer al país de una herramienta diagnóstica para su uso en la identificación de hemoparásitos y demostrar la presencia de co-infecciones de estos agentes en caninos de El Salvador.

La investigación de hemoparásitos es de gran importancia, debido a que al identificar la presencia de estos, se podrán establecer protocolos específicos que garanticen disminuir cuadros clínicos graves que terminen con la muerte de los pacientes. Este proyecto surge de la necesidad de buscar métodos diagnósticos más específicos para estas enfermedades en caninos, debido a que los signos y síntomas clínicos son muy parecidos, lo cual hace difícil su diagnóstico diferencial.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes.

El estudio de las enfermedades transmitidas por vectores ha adquirido gran relevancia en los últimos años, debido al crecimiento exponencial de las mismas y el riesgo de transmisión al ser humano. En caninos, existen diferentes agentes de importancia veterinaria transmitidos por vectores comunes, como las garrapatas, que han sido asociadas incluso a picadura en seres humanos (Romero *et al.*, 2011).

La literatura nos indica la necesidad de buscar métodos diagnósticos más específicos para estas enfermedades en caninos, debido a que los signos y síntomas clínicos son muy parecidos, lo cual hace difícil su diagnóstico diferencial (Rojas *et al.*, 2014).

En Centro América los países que más han investigado sobre Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Babesiosis y Hepatozoonosis son Costa Rica, Panamá y Nicaragua (Romero *et al.*, 2011; Santamaría *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014).

Nicaragua realizó un estudio en 39 caninos de los cuales se obtuvieron resultados positivos de infección a *Ehrlichia canis* (56%), *Babesia* spp (26%) y *Anaplasma platys* (13%), el estudio también reflejó la existencia de co-infecciones entre los agentes antes mencionados (Wei, *et al.* 2014). Romero, *et al* 2011, reporta en Costa Rica un resultado positivo a *E. canis*, por PCR anidado, en 47.7% de 310 muestras analizadas; otro estudio en ese mismo país, detectó *E. canis* en un 34% de los caninos muestreados, *Anaplasma platys* 10% y *Babesia vogeli* 8% en diferentes provincias del país (Rojas *et al.*, 2014). Panamá es otro país de la región que también ha realizado estudios en el tema, de 201 caninos sintomáticos evaluados con PCR anidado, 64.2% de las muestras resultaron positivas a *Ehrlichia canis* y 21.4% con *Anaplasma platys*. En el estudio también se reportan co-infecciones con ambos agentes (Santamaría *et al.*, 2014).

En El Salvador, no existen estudios de detección de antígeno de hemoparásitos en caninos; sin embargo, hay sospecha de la existencia de ehrlichiosis como una enfermedad muy común en caninos con alta incidencia en el país. Es importante por tanto, determinar la presencia del antígeno de ehrlichiosis y la existencia o ausencia de otros agentes hemoparásitos capaces de causar enfermedad en caninos, dado que sus síntomas clínicos son similares y muchos de ellos poseen un potencial zoonótico (Dumler *et al.*, 2001). Hoy en día se realizan pruebas serológicas como las pruebas rápidas SNAP 4DX y frotis sanguíneos, pero no se cuenta con estudios moleculares que permitan un diagnóstico definitivo de estas enfermedades.

2.2 ANAPLASMA SPP.

Anaplasmosis canina es causada por *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*, que son bacterias gram-negativas, intracelulares obligadas que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae*. *A. phagocytophilum* infecta predominantemente neutrófilos pero también eosinófilos, donde forma mórulas. *Ixodes ricinus* es la especie de

garrapata que funciona como principal vector de *A. phagocytophilum* en Europa. A diferencia del anterior, *Anaplasma platys* forma mórulas dentro de plaquetas y su principal vector es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Dumler *et al.*, 2001).

Co-infecciones con otros patógenos que se transmiten con las mismas especies de garrapatas puede ocurrir e influir en las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Wei *et al.*, 2014).

2.2.1 *A. phagocytophilum*

Se transmite por garrapatas durante la ingestión de sangre y de forma transtadial (es decir, de larva a ninfa y de ninfa a adulto), pero no transováricamente (de adulto a huevo). Perros y gatos se infectan después de la exposición a ninfas o garrapatas adultas, que adquieren la infección cuando se alimentan de la sangre de los animales que poseen este agente. Las garrapatas deben atacar de 36 a 48 horas para que la transmisión se produzca (Atif, 2015).

Los organismos entran en la dermis mediante una picadura de garrapata y luego se extienden a través de la sangre y / o la linfa y se localizan en granulocitos maduros, principalmente en neutrófilos a través de endocitosis y también en eosinófilos de sangre periférica (Taylor *et al.*, 2016).

A. phagocytophilum sobrevive en el duro ambiente de los neutrófilos a través de la desregulación de la función de los neutrófilos y sin pasar por las vías fagolisosómicas. Inhibe la producción de superóxido y puede reducir la motilidad de neutrófilos y la fagocitosis. *A. phagocytophilum* también reduce en los neutrófilos la adhesión al endotelio e inhibe la transmigración de neutrófilos en los tejidos, posiblemente a través de regulación a la baja de selectina. Esto puede promover su supervivencia en sangre periférica normalmente, los neutrófilos circulan durante 10 a 12 horas antes de entrar en los tejidos y se someten a la muerte por apoptosis. *A. phagocytophilum* retrasa la apoptosis de neutrófilos, lo que permite sobrevivir largos períodos de tiempo dentro del neutrófilo (Atif, 2015).

2.2.2 *Anaplasma platys*

Infecta y forma inclusiones dentro de las plaquetas y es causante de la trombocitopenia cíclica canina, o también llamada anaplasmosis trombocitopénica. Los organismos están muy extendidos en todo el mundo, y las infecciones se producen a lo largo de América, Europa, Asia, Australia, Oriente Medio y África. La garrapata *R. sanguineus*, se cree la fuente de transmisión de *A. platys*, porque el ADN de *A. platys* con frecuencia se ha encontrado en *R. sanguineus*, y los perros infectados con *A. platys* están infectados a menudo con *E. canis*. Además el ADN de *A. platys* se ha encontrado en otras especies de garrapatas, como *Dermacentor auratus* garrapatas en Tailandia, *Rhipicephalus turanicus* garrapatas de Israel, y *Haemaphysalis spp.* e *Ixodes nipponensis* garrapatas de Korea del norte. Existen diferentes cepas de *A. platys* que parecen variar en la patogenicidad. El organismo nunca ha sido aislado en cultivo celular. *Anaplasma platys* causa trombocitopenia en perros, con mayor frecuencia en ausencia de otros signos clínicos, aunque la fiebre, letargo,

linfadenopatía, uveítis, palidez y hemorragias en mucosas tienden a describirse (Atif, 2015).

Tanto los animales como los seres humanos pueden ser co-infectados con diferentes *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Babesia* y las especies por *arbovirus*. La infección con cualquiera de estos organismos causa una amplia gama de anormalidades clínicas y patológicas, que van en la severidad de la infección asintomática a la muerte (Taylor *et al.*, 2016).

Co-infección de los perros con *A. platys* y *E. canis* pueden conducir a una anemia más grave que la que ocurre con infecciones solas de *E. canis* (Jane, 2014).

La trombocitopenia se produce de uno a dos semanas después de la inoculación experimental. Este episodio inicial se asocia con el mayor número de organismos en las plaquetas. El recuento de plaquetas se produce de dos a tres semanas después de la infección y, en algunos perros los resultados pueden ser inferiores a 20,000 plaquetas. Los organismos visibles desaparecen y el recuento de plaquetas vuelve a los límites normales o casi normales dentro de tres a cuatro días. La trombocitopenia y bacteriemia entonces pueden ocurrir a intervalos de 7 a 14 días, después de lo cual la infección y trombocitopenia persisten en algunos perros, pero mórulas o inclusiones llegan a ser más difícil de detectar (Atif, 2015).

2.3 BABESIA SPP.

Babesiosis, causada por organismos del género *Babesia spp.* se caracteriza por producir anemia hemolítica, fiebre y esplenomegalia, cursando de manera subclínica o como grave enfermedad que amenace la vida. *Babesia spp.* es un parásito protozoario intraeritrocítico del filo Apicomplexa, en total, más de 100 especies de *Babesia* se han descrito, y con el avance de técnicas moleculares, tales como los ensayos de PCR, nuevas especies y genotipos se identifican cada año (Jane, 2014).

Las especies de babesia se han nombrado e identificado basado en el hospedero vertebrado y el tamaño del parásito (especies *Babesia* grande y/o pequeño). Las babesias grandes pueden medir de 4 a 5 μ de longitud, mientras que las babesias pequeñas son de 2 a 4 μ de longitud (Taylor *et al.*, 2016).

Babesiosis canina es una enfermedad de importancia mundial. Inicialmente, dos especies de *Babesia* se reconocieron en los perros (*Babesia canis* y *B. gibsoni*); sin embargo, se han descrito ahora por lo menos nueve piroplasmas caninos genéticamente distintos. Las especies de *Babesia* que infectan a los perros varían en su distribución geográfica, que a su vez ha estado sujeto a cambios, debido al movimiento de animales infectados, el movimiento de las garrapatas vectores, y la reclasificación con la mejora de las técnicas de diagnóstico. Como han reconocido nuevas especies, se ha vuelto más importante entender las diferencias en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento por infección por cada especie (Jane, 2014)

En la mayoría de las partes del mundo, los vectores garrapatas son el medio más importante de transmisión de especies de *Babesia*; sin embargo, para algunas especies de *Babesia*, como *Babesia gibsoni* en América del Norte y Europa, la transmisión directa se da entre los perros, a través de las luchas entre sí (y el intercambio de la sangre), o la transmisión transplacentaria congénita, siendo la ruta más común de transmisión cuando las garrapatas como vectores están ausentes. Cuando las garrapatas están involucradas en la transmisión, estos se alimentan de la sangre y los esporozoítos son liberados de las glándulas salivales, entrando al torrente sanguíneo de los vertebrados. Luego, se adhieren y entran al eritrocito por endocitosis. Dentro de los eritrocitos, se realiza la reproducción asexual (merogonia), y las células hijas infectan nuevos eritrocitos. Una garrapata luego ingiere eritrocitos infectados y sigue con la transmisión. En el intestino medio de la garrapata, la fase de la reproducción sexual se produce cuando los gametocitos se fusionan para formar un cigoto. El cigoto invade las células epiteliales del intestino de la garrapata. Las formas resultantes, salen de la célula epitelial e invaden ya sea la glándula salival o el ovario, donde participan en la transmisión transestadial y transovarial, respectivamente. Antes de la transmisión, otra forma de la reproducción asexual se produce en la glándula salival, llamado esporogonio (Jane, 2014).

2.3.1 *Babesia canis*

Babesia canis es la especie más común de grandes *Babesia* y tiene tres subespecies distintas: *B. canis vogeli*, *B. canis canis* y *B. canis rossi*, cada una transmitida por garrapatas vectores diferentes (Taylor *et al.*, 2016).

B. canis vogeli es transmitida por la garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*). La infección se diagnostica con mayor frecuencia en las regiones cálidas y húmedas del mundo, y la enfermedad se presenta durante todo el año en las regiones endémicas. *B. canis vogeli* se puede encontrar en África, Asia, Australia, Europa y en América (Dantas, 2010).

2.3.2 *B. canis canis*

Se encuentra en Europa y África, se transmite por la garrapata, *Dermacentor reticulatus*, pero *R. sanguineus* también puede ser un vector. Las tasas de prevalencia más altas se encuentran con mayor frecuencia en las zonas rurales o suburbanas que están junto a pastizales o bosques que proporcionan un hábitat adecuado para *D. reticulatus*. La infección de *B. canis canis* es más a menudo diagnosticada en Francia. Las infecciones se reportan también con frecuencia en otros países europeos como Croacia, Polonia, y Alemania, posiblemente debido a cambios en la distribución de *D. reticulatus* (Dantas, 2010).

2.3.3 *B. canis rossi*

Es transmitida por la garrapata, *Haemaphysalis elliptica* (antes *Haemaphysalis leachi*). Los informes de Infección por *B. canis rossi* se han limitado a África, con la gran mayoría de los informes procedentes de Sudáfrica, donde más de 10% de los perros evaluados en algunos hospitales veterinarios suelen ser afectados. La incidencia de infección es mayor durante los meses de verano. Predisposiciones en cuanto a razas

para la infección no tienen antecedentes, pero las razas de combate tradicionales (Pitbull, Bull terriers y Staffordshire) son más propensos a morir cuando son diagnosticados con severa babesiosis (De caprariis *et al.*, 2011).

2.3.4 Babesia gibsoni

Las infecciones con *B. gibsoni* se producen en todo el mundo, y la naturaleza insidiosa de esta infección ha permitido el transporte de los perros infectados de Asia a otras áreas. *B. gibsoni* se puede encontrar en África, Asia, Australia, América y Europa. Dependiendo de la disponibilidad de vectores adecuados. Existen dos escenarios epidemiológicos diferenciados para *B. gibsoni*: la transmisión por garrapatas y la transmisión directa entre caninos. *B. gibsoni* se transmite principalmente por las garrapatas *Haemaphysalis bispinosa*, *Haemaphysalis longicornis* y posiblemente por *R. sanguineus* (Dantas, 2010).

En las razas de pelea, la transmisión se ha asociado a una pelea o mordida por un perro infectado o haber nacido de una perra infectada, en donde la transmisión perinatal también se cree que ocurre. La patogenicidad de los organismos de *Babesia* se determina principalmente por la especie y cepa involucradas. Los factores del hospedero, como la edad y la respuesta inmunológica generada en contra del parásito o garrapata vector, también son importantes. Aunque es más común las infecciones subclínicas, los perros infectados con especies "virulentas" tales como *B. canis vogeli* puede tener la enfermedad clínica severa. Del mismo modo, perros infectados con especies, tales como *B. canis rossii* pueden presentar infección subclínica sin manifiesta de hallazgos clínicos o de laboratorio. Los signos y síntomas más comunes de babesiosis incluyen fiebre, trombocitopenia, anemia hemolítica y esplenomegalia. Los perros a menudo tienen signos inespecíficos tales como letargo, anorexia y debilidad. Ocasionalmente se observan palidez de la mucosa, o decoloración de la orina causada por bilirrubinuria o hemoglobinuria (De caprariis *et al.*, 2011).

Una vacuna se ha lanzado recientemente en Europa para su uso contra *B. canis*, la vacuna contiene proteínas de superficie expresadas por los cultivos de *B. canis* y *B. canis rossii*, proporcionando una protección de hasta seis meses (Taylor *et al.*, 2016).

Co-infecciones con otros agentes patógenos transmitidos por garrapatas también pueden influir en los signos clínicos de enfermedad (De caprariis *et al.*, 2011).

2.4 EHRLICHIA SPP.

Las ehrlichiosis es causada por bacterias gram-negativas pleomórficas, intracelulares en formas de mórulas que incluyen *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffeensis*. Las etapas más tempranas son pequeños cuerpos elementales 0.2-0.4 micras de diámetro, seguido de organismos iniciales ligeramente más grandes 0,5-4 micras de diámetro, y por último, los cuerpos de inclusión aún más grandes 4-6 micras de diámetro (Taylor *et al.*, 2016).

Ehrlichia canis infecta monocitos y causa ehrlichiosis monocítica canina (CME), uno de los más importantes enfermedades infecciosas de los perros domésticos que están expuestos a garrapatas en todo el mundo. *Ehrlichia ewingii* es una bacteria que infecta granulocitos y produce la ehrlichiosis granulocítica canina. *Ehrlichia chaffeensis* causa ehrlichiosis monocítica humana, los perros son el principal reservorio de estos organismos. La distribución geográfica de cada patógeno se restringe generalmente a la de sus vectores y reservorios mamíferos. Los organismos del género *Ehrlichia* se agrupan dentro de la familia *Anaplasmataceae*. También dentro de esta familia se encuentran las bacterias *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*, que causan trombocitopenia canina y anaplasmosis granulocítica, respectivamente; y los organismos que pertenecen a los géneros *Neorickettsia*. Las familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae* están filogenéticamente relacionados a través del orden *Rickettsiales* (Dumler *et al.*, 2001).

La reciente disponibilidad de las secuencias del genoma completo de estos organismos ha ayudado a descubrir los mecanismos de patogénesis e interacción hospedero-patógeno. La gravedad de los signos clínicos en los animales con infecciones de *Ehrlichia* depende de factores tales como el tamaño del inóculo, la inmunidad del hospedador y las especies de organismos infectantes. Debido a que comparten los mismos vectores como garrapatas, las co-infecciones con más de un hemoparásito se producen comúnmente en perros y hacen más complicado el cuadro clínico. *E. canis* se transmite principalmente por la garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*), una de las garrapatas más ampliamente distribuida en todo el mundo (Dantas, 2010).

El ADN de *E. canis* ha sido detectado en otras especies de garrapatas, que incluyen otras especies de *Rhipicephalus*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis spp.* y *Dermacentor spp.*; la transmisión experimental se ha logrado con *Dermacentor variabilis*. Existen diferentes cepas de *E. canis* que puede variar en la virulencia. Larvas o ninfas adquieren la infección cuando se alimentan de perros infectados. Chacales, zorros y coyotes también actúan como reservorios (Jane, 2014).

2.4.1 *E. canis*

Se transmite transestadial (es decir, de larva a ninfa y de ninfa a adulto) dentro de la garrapata. El curso de la CME (Ehrlichiosis Monocítica Canina) se ha dividido en aguda, subclínica, y las fases crónicas, aunque en los perros infectados de forma natural, estas fases pueden no ser fácilmente distinguibles. Los signos clínicos de la enfermedad aguda se producen 8 a 20 días después de la infección. El organismo se multiplica por fisión binaria dentro de vacuolas de fagocitos mononucleares; se da ruptura de las células infectadas por el hospedero lo que conduce a la infección de nuevos órganos y sistemas (Taylor *et al.*, 2016).

Las manifestaciones clínicas varían considerablemente entre los perros, debido a factores tales como variación de la cepa de *E. canis*, la respuesta inmune, estadio de la enfermedad, e infecciones concurrentes. La replicación del organismo en los tejidos reticuloendoteliales se asocia con linfadenopatía generalizada y esplenomegalia, secreción ocular y nasal, edema periférico y con menor frecuencia de la mucosa.

También pueden ocurrir hemorragias petequiales y equimóticas cutáneas. Los desórdenes hemorrágicos resultan de la trombocitopenia y disfunción plaquetaria, que puede reflejar daños neurológicos. Los perros puede recuperarse espontáneamente de la fase aguda dentro de 2 a 4 semanas, después de ese tiempo pueden eliminar la infección subclínica o permanecer infectados. La CME crónica se desarrolla solo en algunos perros infectados. Los factores que influyen en el desarrollo de enfermedades crónicas no están claros, pero la genética puede jugar un papel. Los signos clínicos varían en gravedad e incluyen letargo, inapetencia, tendencia al sangrado, mucosa pálidas, fiebre, pérdida de peso, linfadenopatía, esplenomegalia, disnea, uveítis, hemorragia, desprendimiento de retina, poliuria / polidipsia y edema. Polimiositis ocurre en algunos perros, que pueden manifestarse por atrofia muscular difusa y las infecciones oportunistas secundarias tales como tetraparesis, papilomatosis viral, infecciones por protozoos, e infección de las vías urinaria también pueden desarrollarse (Jane, 2014).

2.4.2 Ehrlichia ewingii

Es una bacteria intracelular gram-negativa pleomórfica que afecta neutrófilos y eosinófilos (Taylor *et al.*, 2016).

Ehrlichia ewingii es una bacteria que causa la ehrlichiosis granulocítica en humanos como en perros. Fue primero reconocido en los perros y se produce en América del Norte y más recientemente se ha detectado en perros de África y Brasil. La infección se produce en las partes surcentro y sureste de los Estados Unidos, que refleja la distribución de la vector primario, *Amblyomma americanum*. La transmisión dentro de la garrapata es transestadial (Jane, 2014). Tras el contacto con el vector *Ehrlichia ewingii* entra al torrente sanguíneo y los vasos linfáticos y se localizan en los neutrófilos. La enfermedad entre sus síntomas generales provoca una poliartritis en perros con infección crónica. Claudicación, inflamación de las articulaciones y fiebre son signos clínicos comunes. Cambios hematológicos son leves e incluyen trombocitopenia y anemia (Taylor *et al.*, 2016).

2.4.3 Ehrlichia chaffeensis

Es una bacteria intracelular gram-negativa pleomórfica, en forma de racimo o mórula (Taylor *et al.*, 2016).

Ehrlichia chaffeensis causa ehrlichiosis monocítica humana en América del Norte, una enfermedad emergente que se caracteriza en pacientes humanos por fiebre, cefalea, mialgias, trombocitopenia y leucopenia, y elevaciones en transaminasas hepáticas, signos gastrointestinales y afectación neurológica. Evidencia de ADN de *E. chaffeensis* también se ha encontrado en perros y otras especies animales (incluyendo los gatos) y garrapatas en África, Israel, América y Asia. El microorganismo se transmite transestadial dentro de la garrapata, que se alimenta agresivamente en los seres humanos. En los perros infectados de forma natural, *E. chaffeensis* se ha asociado con signos clínicos de linfadenopatía, uveítis anterior, y epistaxis, pero las implicaciones clínicas de esta infección para los perros aún no están claras. Los perros mantienen altos títulos de anticuerpos y son PCR positivos en meses después de la infección, que apoya un posible papel del perro como un reservorio (Jane, 2014).

2.5 HEPATOZOON SPP.

Hepatozoon se encuentra en el citoplasma de los neutrófilos, tiene una forma elipsoidal y de estructura pleomórfica (Taylor *et al.*, 2016).

La Hepatozoonosis en perros es causada por *Hepatozoon canis*, es una enfermedad transmitida por vectores reportada en Europa y recientemente también en el Norte y Sur de América. El parásito *H. canis* (suborden Adeleorina: Familia Hepatozoidae) tiene un ciclo de vida que implica vertebrados como hospederos intermediarios, incluidos perros domésticos, cánidos salvajes y a garrapatas como hospederos definitivos (Baneth, 2012).

Infecciones autóctonas con *H. canis* son frecuentes en perros de áreas tropicales, subtropicales o clima templado donde su principal vector es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas *et al.*, 2013).

La hepatozoonosis es una enfermedad causada por protozoarios (Apicomplexa) del género *Hepatozoon*, los cuales están estrechamente relacionados a *Plasmodium* y *Piroplasma*. Hasta la fecha, son dos las especies de *Hepatozoon* que afectan a cánidos, tanto domésticos como silvestres, *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum*. En el año 2000 se reconoce a *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum* como especies distintas (Baneth, 2011).

El ciclo de *Hepatozoon spp.* incluye dos hospedadores: la garrapata ixodídea, que es el hospedador definitivo, en donde se lleva a cabo la fase sexual del ciclo; y el perro u otro mamífero, que es el hospedado intermediario, en donde ocurre la reproducción asexual del parásito. Cada ooquiste, cuando madura, presenta de 30 a 50 esporocístos cada uno, conteniendo cerca de 16 esporozoítos. No se ha demostrado que éstos migren a la glándula salival o piezas bucales, por lo tanto, la transmisión se produce por la ingestión de una garrapata infectada. Es importante resaltar que la infección en la garrapata se inicia en el estadio de ninfa y se completa en el de adulto, es decir, que posee transmisión transtadial, provocando la transmisión a nuevos hospedadores vertebrados. No se ha comprobado aún que haya transmisión transovárica. Una vez ingerida la garrapata infectada, por un perro o mamífero susceptible, los esporozoítos son liberados de los ooquistes, penetran la pared intestinal y son transportados (posiblemente dentro de una célula fagocitaria) a los tejidos y órganos (Baneth, 2011).

Hepatozoon canis difunde a través de la sangre o linfa e infecta principalmente órganos hemolinfáticos como el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, así como hacia otros órganos internos como el hígado, riñones y pulmones; esto último puede ocasionar en forma respectiva: hepatitis, glomerulonefritis y neumonitis. En los tejidos del perro tiene lugar el proceso de merogonia, por el cual se forman los merontes, en los que se produce una división asexual de los merozoítos. Se detectan dos tipos de merontes en los tejidos infectados: uno conteniendo macromerozoítos (grandes) y otro micromerozoítos (delgados). Los micromerozoítos se liberan de los merontes maduros, invaden los neutrófilos y monocitos, y se transforman en gamontes mediante

el proceso de gametogonia; en cuanto a los macromerozoítos, continúan el ciclo esquizogónico (Baneth & Vincent-Johnson, 2005).

El ciclo de vida de *H. canis* se completa dentro de los 81 días. En un estudio de transmisión experimental, garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, en estado adulto, resultaron infecciosas para los perros a los 53 días después de que en estado de ninfas se alimentaran de perros con infección natural. Merontes se detectaron por primera vez a los 13 días pos inoculación en la médula ósea, y gamontes en la sangre a los 28 días (Baneth *et al.*, 2003).

A diferencia de la mayoría de las enfermedades transmitidas por garrapatas, que lo hacen a través de sus glándulas salivales, *Hepatozoon spp.*, es transmitido principalmente, por la ingestión de garrapatas portadoras de ooquistes esporulados. De la misma manera, la garrapata se infecta al ingerir sangre de un perro parasitado. En el caso de *H. canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, es considerado su vector principal. En cuanto a la sintomatología de la enfermedad por *H. canis*, todavía existen algunas divergencias en cuanto a su patogenicidad y de la naturaleza oportunista de este parásito. Algunos autores postulan que las infecciones por *H. canis* son asintomáticas, ya que el parásito frecuentemente es encontrado en leucocitos de caninos clínicamente sanos, considerando que el hallazgo de gamontes en la circulación sanguínea es ocasional, y atribuyendo eventuales signos clínicos en perros parasitados a otros agentes infecciosos, inmunosupresión y al grado de parasitismo. La infección por *H. canis* varía desde asintomática, en perros aparentemente sanos, a una enfermedad grave y potencialmente fatal caracterizada por fiebre, anorexia, letargia, caquexia, síntomas característicos de enfermedad de carácter crónico debilitante (Baneth, 2011).

H. canis se encuentra en asociación con otros agentes infecciosos, especialmente Ehrlichia y Babesia, como resultado de esto, los síntomas son aún menos específicos y comprometen aún más la vida del paciente (Taylor *et al.*, 2016).

Se ha observado parasitado un mismo neutrófilo, tanto por gamonte de *H. canis* como por mórula de *Ehrlichia canis*, esto se le atribuye a su vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la que puede transmitir simultáneamente otros patógenos (Baneth, 2011).

Las alteraciones de laboratorio más frecuentemente encontradas en caninos infectados por *H. canis* son anemia, leucocitosis y trombocitopenia; en cuanto al estudio de bioquímica suele encontrarse hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, aumento de las enzimas fosfatasa alcalina y creatina quinasa. Los altos niveles de parasitemia son, con frecuencia, acompañados de extrema neutrofilia, la cual puede tomar valores de hasta 150.000 neutrófilos/ml, reflejando un gran número de merontes en los tejidos, lo que causaría su costo en el hospedador, exigiendo nutrientes y explicando la caquexia y debilitamiento (Baneth *et al.*, 2003).

Técnicas moleculares, han sido desarrolladas para la detección de perros infectados por *H. canis*, principalmente PCR, la cual utilizada en sangre entera o en la capa de blancos, ha demostrado tener la mayor especificidad y sensibilidad (Otranto *et al.*, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Descripción del estudio.

3.1.1 Ubicación geográfica.

La investigación se realizó en tres clínicas veterinarias de Santa Tecla (La Libertad) y siete clínicas veterinarias ubicadas en la región metropolitana de San Salvador, incluyendo la Clínica Veterinaria de especies menores de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Las clínicas están a una altura entre 600 y 1500msnm.

La selección de las clínicas participantes, estuvo dada por la disposición de sus propietarios de compartir información de sus pacientes con sospechas de hemoparásitos, tomando en cuenta que esta será una herramienta diagnóstica al finalizar todo el trabajo de la investigación.

3.1.2 Duración de la Investigación.

El análisis de muestras abarcó un período de meses (mayo 2016 a marzo de 2017) y comprendió dos fases: una de recolección de muestra y otra de laboratorio en donde se procesaron dichas muestras.

3.2 Metodología de campo.

Para el desarrollo del estudio, se realizó una encuesta (A-1) con el fin de obtener información de los métodos de diagnóstico para confirmar las enfermedades de interés del estudio, identificar los síntomas asociados y la cantidad de casos que se presentan semanalmente, todo esto con previa autorización por parte de los médicos veterinarios de las clínicas seleccionadas; así mismo, se informó al dueño de la mascota sobre la importancia de la enfermedad y se solicitó la firma del consentimiento informado, para la realización de la toma de sangre y evaluación del estado de salud de su mascota.

3.2.1 Características para la selección de las clínicas veterinarias.

Las clínicas veterinarias que participaron en la investigación cumplieron con ciertos criterios de selección tales como: disposición del médico veterinario para participar en el estudio, llevar un registro de información actualizado de cada paciente, contar con una población de al menos 20 pacientes por consulta a la semana.

El Médico Veterinario dispuesto a formar parte del estudio se comprometió a estar en comunicación para informar sobre la toma de muestras y para la recolecta de las mismas cada semana, lo que aseguró que las muestras no perdieran su calidad (Matamala, 2009). Además, el médico veterinario completó un registro e historial clínico de cada paciente y así se verificó que contara con los requisitos planteados en la investigación (A-2)

3.2.2 Selección de animales

Los criterios que se tomaron para poder seleccionar los caninos a muestrear fueron: el propietario debía estar dispuesto a llenar una ficha de información general de su mascota, además de estar de acuerdo en la toma de muestra (A-3), que el Médico Veterinario de cabecera y/o responsable de la clínica veterinaria sospechara de una enfermedad producida por hemoparásitos, presentar síntomas relacionados a los agentes a investigar, presentar proceso febril que no estuviera relacionado con alguna otra enfermedad y debía poseer antecedentes previos a infestación con garrapatas (6-12 meses).

Después de haber obtenido esta información se procedió a recolectar la muestra de sangre ya sea de la vena cefálica o femoral en tubos de ensayo plásticos con anticoagulante E.D.T.A (ácido etilendiaminotetraacético) con capacidad para 3 ml de sangre entera, la cual fue debidamente rotulada e identificada (Nombre, edad, procedencia). Para la extracción se utilizaron jeringas descartables de 3 a 5 ml. Una vez obtenida la muestra se mantuvo a temperatura ambiente por un lapso de cuatro horas sin necesidad de refrigeración, en caso de exceder este tiempo se refrigeró a una temperatura de 4°C. Las muestras pueden ser almacenadas hasta por una semana en refrigeración y en caso de ser necesario, congelarse a una temperatura de -18°C hasta un año (Matamala, 2009).

Las muestras fueron transportadas desde la clínica veterinaria hasta el lugar de procesamiento en cajas herméticas o hieleras tipo Coleman de forma ordenada y segura en gradillas o receptáculos que impidieron el volcamiento o golpes. Los contenedores llevaban en su fondo un material absorbente para que todo derrame involuntario producido por accidente fuera absorbido.

3.3 Metodología de laboratorio.

3.3.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 100 muestras de sangre entera provenientes de los caninos previamente seleccionados. Para tal fin, se empleó el “**High Pure PCR Template Preparation Kit**”, siguiendo las instrucciones del fabricante (Manual de procedimientos incorporado en cada “High Pure PCR Template Preparation Kit”) como se describe a continuación:

Preparación de soluciones de trabajo:

- Proteinasa K. Disolver en 4.5 ml de agua bidestilada. Preparar alícuotas de 450µl. Almacenar a -20°C.
- “Inhibitor removal buffer”. Agregar 20ml de etanol absoluto. Refrigerar.
- “Wash buffer”. Agregar 80ml de etanol absoluto. Almacenar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

- Calentar la Solución Tampón de Elución (Elution Buffer) a 70°C en el Termobloque.
- Identificar los tubos de microcentrífuga para cada muestra.
- Agregar 200µl de sangre entera de cada muestra, colocándolos en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml libre de nucleasas.
- Agregar 200µl de “binding buffer”.

- Agregar 40µl de proteinasa K reconstituida.
- Mezclar inmediatamente en vórtex e incubar a 70°C durante 10 minutos.
- Agregar 100µl de isopropanol y mezclar bien en vórtex.
- Ensamblar un tubo de filtro de alta pureza dentro de un tubo colector.
- Pipetear la muestra y depositar en el reservorio del filtro ensamblado con el tubo colector.
- Insertar el conjunto de tubo de filtro de alta pureza en una centrífuga.
- Centrifugar 1 minuto a 8,000 x g.
- Después de la centrifugación, remover el tubo de filtro del tubo colector. Descartar el líquido y el tubo colector.
- Ensamblar el tubo de filtro en un nuevo tubo colector.
- Agregar 500 µl de “inhibitor removal buffer” en el reservorio del tubo de filtro.
- Centrifugar 1 min a 8,000 x g.
- Remover el tubo de filtro del tubo colector. Descartar el líquido y el tubo colector.
- Ensamblar el filtro en un nuevo tubo colector.
- Agregar 500 µl de “wash buffer” en el reservorio del tubo de filtro.
- Centrifugar 1min a 8,000 x g. y descartar el líquido.
- Remover el filtro del tubo colector. Descartar el líquido y el tubo colector.
- Ensamblar el filtro en un nuevo tubo colector.
- Agregar 500µl de “wash buffer” por segunda ocasión.
- Centrifugar 1 min a 8,000 x g. y descartar el líquido.
- Después de descartar el líquido, centrifugar el tubo ensamblado por 10 segundos a toda velocidad.
- Descartar el tubo colector.
- Para extraer ADN, se debe insertar el filtro en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml estéril y limpio.
- Agregar 100µl de “elution buffer” (precalentado a 70°C), en el reservorio del tubo de filtro.
- Centrifugar el tubo ensamblado por 1 min a 8,000 x g. El tubo de microcentrífuga ahora contiene el ADN extraído. Este ADN puede utilizarse directamente para la PCR o puede almacenarse en +2 a +8°C o -15 a -25°C para su análisis posterior (Figura A-1).

3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1- PCR para la detección de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp, y *Hepatozoon canis*.

Se realizó la PCR en búsqueda de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp y *Hepatozoon canis*, empleando el protocolo de diagnóstico desarrollado por Kledmanee *et al.*, 2009 que consiste en un Multiplex PCR.

Para ello se empleó las siguientes secuencias de cebadores (primers):

Patógeno	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehr1401F	CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTACAA	380pb
	Ehr1780R	TGGATAATAAAACCGTACTATGTATGCTAG	
<i>Babesia</i> spp.	Ba103F	CCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACA	619pb
	Ba721R	CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCTCAAG	
<i>Hepatozoon canis</i>	Hep001F	CCTGGCTATACATGAGCAAATCTCAACTT	737pb
	Hep737R	CCAAGTGTCCCTATCAATCATTAAAGC	

El protocolo de amplificación fue realizado de acorde a Kledmanee *et al.*, 2009, tomando en cuenta que se realizaron modificaciones en tiempo y temperatura, de la siguiente manera:

Cada tubo de reacción constó de 50 µl, conteniendo 5 µl de ADN extraído de la muestra problema, 0.4 pmol de cada primer, 300 µM de cada dNTP, 4 U de *Taq* ADN polimerasa, 1X de PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂ y agua estéril. El termociclaje consistió de 7 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 70 segundos a 61°C y 70 segundos a 72°C, con un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C, luego 4° por tiempo indefinido. El producto amplificado se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelRed® y se observó bajo Luz Ultravioleta (Figura A-2 y Figura A-3).

2- PCR para la detección de *Anaplasma platys*.

Para el caso de PCR en busca de *Anaplasma platys*, se empleó el protocolo desarrollado por Martin *et al.*, 2005 y Gal *et al.*, 2007; empleando los siguientes cebadores, tomando en cuenta que se realizó modificaciones en tiempo y temperatura:

Patógeno	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto
<i>Anaplasma platys</i>	PLATYS	GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG	678pb
	Ehr16Sr	TAGCACTCATCGTTTACAGC	

Cada tubo de reacción constó de 50 µl, conteniendo 5 µl de ADN extraído de la muestra problema, 12.5 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1.25 U de *Taq* ADN polimerasa, 1X de PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 3 mM MgCl₂ y agua estéril. El termociclaje consistió de 7 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 34 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 90 segundos a 72°C, con un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C, luego a 4°C por un tiempo indefinido. El producto amplificado se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelRed® y se observó bajo Luz Ultravioleta (Figura A-4).

3.4 Metodología estadística.

Una vez obtenida la información de laboratorio se analizaron los resultados haciendo uso de métodos estadísticos descriptivos tales como: tablas resúmenes y gráficos de barras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se evaluó la presencia de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*; en una población de 100 caninos (unidades experimentales) con sospechas de hemoparásitos, mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las unidades experimentales estaban distribuidas en diez Clínicas Veterinarias de San Salvador y La Libertad, de las cuales se obtuvieron diez muestras por clínica (Cuadro A-1). Los caninos en estudio fueron un total de 52 hembras y 48 machos con edades que oscilaron entre 1 y 14 años de edad.

Del total de muestras analizadas por la técnica de PCR, empleando los protocolos de diagnóstico de Kledmanee *et al.*, 2009 que consiste en un Multiplex PCR en búsqueda de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp y *Hepatozoon canis* y el protocolo desarrollado por Martin *et al.*, 2005 y Gal *et al.*, 2007 para *Anaplasma platys*, se demostró la presencia de al menos un agente en el 60% de las muestras, identificando *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. y *Anaplasma platys*, no detectándose *Hepatozoon canis* en ninguna de las muestras analizadas.

El no hallazgo de *Hepatozoon canis* en el presente estudio no implica la ausencia del agente en las muestras analizadas, ya que deben considerarse factores que influyen en el resultado. Esto se respalda ya que al obtener resultados negativos en todas las muestras, se procedió a realizar una evaluación de las secuencias de los primers (cebadores) empleados en el protocolo utilizado para de identificación de *Hepatozoon canis*, a través de la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST). El BLAST, es un programa que compara secuencias de nucleótidos en una base mundial y calcula la significancia estadística demostrando similaridad con secuencias disponibles de agentes específicos (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De esta manera se demostró que los primers empleados no detectan todas las cepas de *Hepatozoon canis* y por lo tanto, la ausencia en este estudio podría deberse a que se trate de una cepa que no se reconoce con la secuencia desarrollada para el protocolo utilizado. La ausencia del agente en nuestro medio resulta muy difícil de respaldar debido a que en la región, países como Nicaragua y Costa Rica lo han reportado en estudios recientes en sangre de perros, con porcentajes de detección que varían entre el 7.5% al 51% (Rojas *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014 y Wei *et al.*, 2015).

El porcentaje de hallazgo (60%) al menos a un agente, en este estudio, concuerda con los porcentajes de investigaciones realizadas en la región centroamericana, en donde Costa Rica reporta 47% (Rojas *et al.*, 2014), Nicaragua 80% (Wei *et al.*, 2014) y Panamá 70.6% (Santamaria *et al.*, 2014) de hallazgo, al menos a un agente en sangre de perros.

El total de porcentaje de positividad a las pruebas de PCR, incluyendo co-infecciones, fue el siguiente: *Ehrlichia canis* 34% (34 muestras), *Anaplasma platys* 17% (17 muestras) y *Babesia spp.* 21% (21 muestras) (cuadro 1 y figura 1).

Cuadro 1. Porcentaje general de muestras incluyendo co-infecciones

Porcentaje general de muestras incluyendo co-infecciones		
MUESTRAS POSITIVAS	# DE MUESTRAS	PORCENTAJE
<i>E.canis</i>	34	34%
<i>A. platys</i>	17	17%
<i>Babesia spp</i>	21	21%
<i>H. canis</i>	0	0%

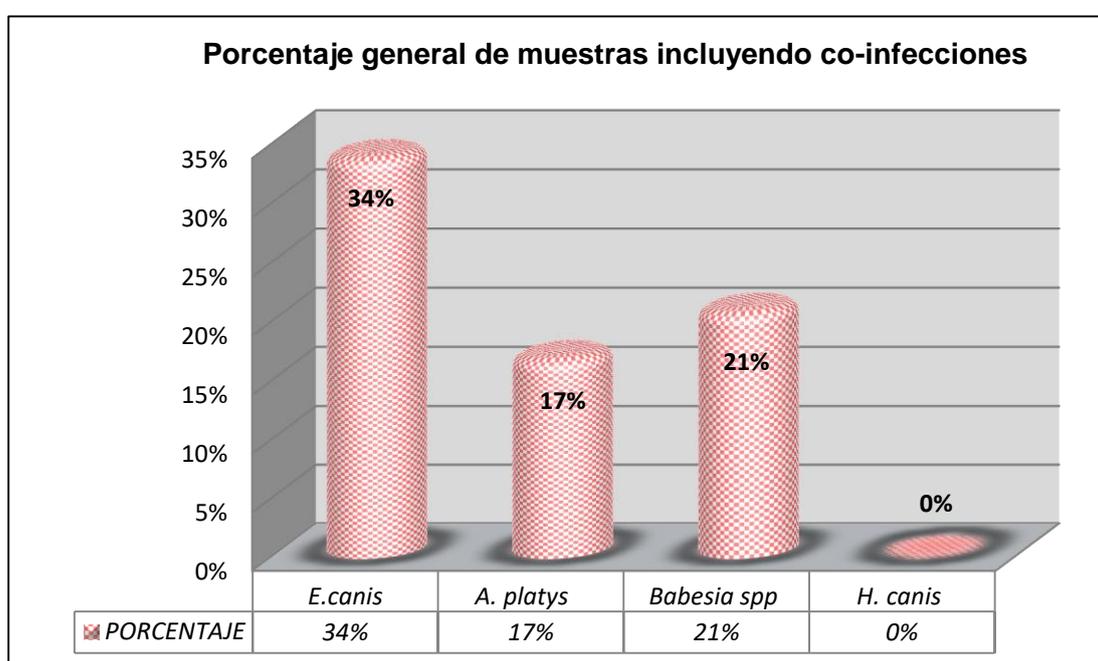


Figura 1. Porcentaje general de muestras incluyendo co-infecciones

Investigaciones similares, utilizando diferentes técnicas de PCR en la región centroamericana, determinaron porcentajes variables de presencia de cada hemoparásito. El presente estudio evidenció hallazgos a *Ehrlichia canis* (34%) similares a una investigación en Costa Rica (34%) (Rojas *et al.*, 2014) pero inferior a otras investigaciones realizadas en Nicaragua (56%), Costa Rica (47.7%) y Panamá (64.2%) (Wei *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2011; Santamaría *et al.*, 2014). El estudio presentó para *Anaplasma platys* (17%) resultados superiores a Nicaragua (13%) y Costa Rica (10%) (Wei *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014) pero resultados inferiores con respecto a Panamá (21.3%) (Santamaría *et al.*, 2014). Para el caso de *Babesia spp.* (21%) se obtuvieron resultados similares a otras investigaciones en la región como el caso de Costa Rica (25%) y Nicaragua (26%) (Wei *et al.*, 2015, Wei *et al.*, 2014), pero superior a otro estudio realizado en Costa Rica en 2014 (8%) (Rojas, *et al.*, 2014) que reportó menor porcentaje al resto de los estudios; sin embargo, este último era

específico para la búsqueda de la especie *Babesia canis vogeli*, sin incluir a otras especies.

Al evaluar las co-infecciones en la presente investigación, los resultados demuestran un 10% de co-infección a dos agentes (Ehrlichia-Anaplasma 4%, Ehrlichia-Babesia 4% y Anaplasma-Babesia 2%) y un 1% a tres agentes (Ehrlichia-Anaplasma-Babesia) (Cuadro 2 y figura 2).

Cuadro 2. Distribución de agentes, en infecciones simples y co-infecciones, en muestras positivas por las técnicas de PCR

DETALLE DE RESULTADOS DE MUESTRAS POSITIVAS		
MUESTRAS POSITIVAS	# DE MUESTRAS	PORCENTAJE
<i>E.canis</i>	25	25%
<i>A. platys</i>	10	10%
<i>Babesia spp</i>	14	14%
<i>E. canis + A. platys</i>	4	4%
<i>E. canis + Babesia spp</i>	4	4%
<i>A. platys + Babesia spp</i>	2	2%
<i>E. canis + A. platys + Babesia spp.</i>	1	1%
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	100	60%

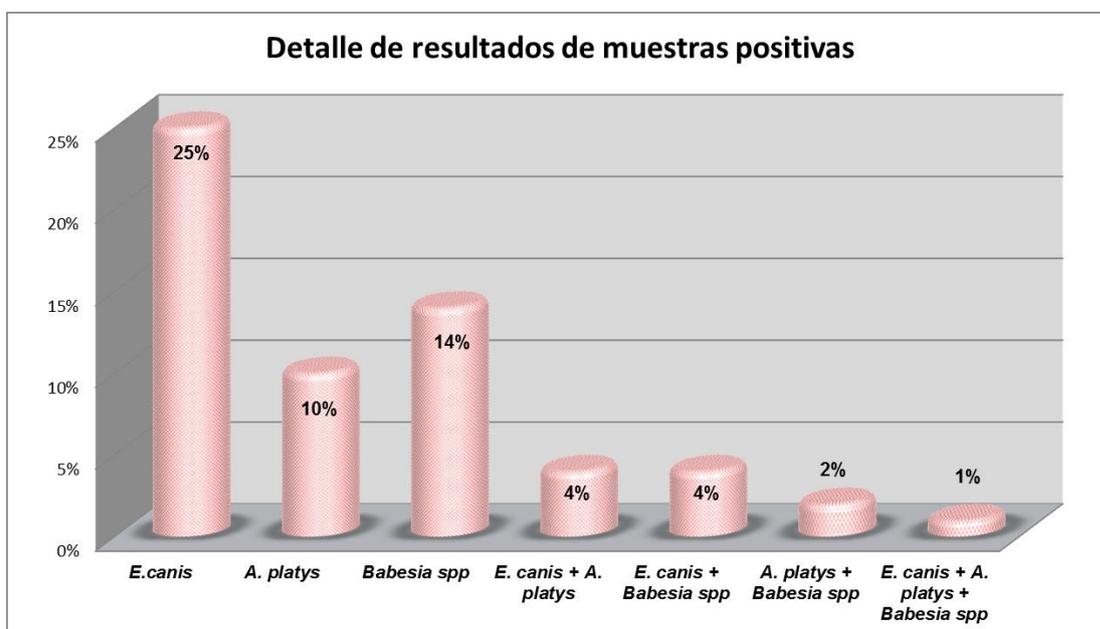


Figura 2. Detalle de resultados de muestras positivas.

En la región, Costa Rica ha evidenciado, en diferentes estudios, la presencia de co-infecciones para dos agentes (10% al 12.3%), para tres agentes (2.5%) y para cuatro

(2.5%) (Rojas *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015). También Panamá ha reportado co-infecciones entre *E. canis* y *A. platys* (7.5%) y Nicaragua presenta porcentajes de co-infecciones para dos (28%), tres (8%) y cuatro (10%) agentes en una misma muestra (Santamaría *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014). En los estudios anteriormente mencionados, los resultados de co-infecciones se relacionan con los agentes *A. platys*, *Babesia* spp. y *E. canis*, además de otros no estudiados en la presente investigación.

La presencia de co-infecciones en nuestro estudio no es un hallazgo extraño, ya que diferentes investigaciones en Latinoamérica señalan a *Rhipicephalus sanguineus* como el principal vector de los cuatro agentes en estudio (Romero *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2014).

Estudios en diferentes zonas tropicales han señalado factores en común que favorecen la prevalencia de los vectores y por lo tanto los agentes asociados, estos factores incluyen: el clima tropical, el aumento de viajes y el transporte de animales de una región a otra (Rojas *et al.*, 2014 y Corrales *et al.*, 2014).

No se consideró someter a evaluación las variables edad, sexo y raza de los caninos, debido a no ser un factor predisponente para la infección por hemoparásitos (Romero *et al.*, 2011).

En cuanto a la distribución de las muestras positivas, ésta fue similar en las diez clínicas participantes, con un promedio de seis muestras con presencia de al menos un agente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de muestras positivas por clínicas veterinarias.

Veterinarias	AGENTES			CO – INFECCIONES				TOTAL
	<i>A. platys</i>	<i>Babesia</i> spp	<i>E.canis</i>	<i>E.canis</i> / <i>A.platys</i>	<i>E. canis</i> / <i>Babesia</i> spp	<i>A. platys</i> / <i>Babesia</i> spp	<i>E. canis</i> / <i>A. platys</i> / <i>Babesia</i> spp	
VLH	0	2	2	0	2	0	1	7
VLHS	0	2	4	0	0	1	0	7
VSP	2	1	2	1	0	0	0	6
VPP	2	1	2	0	0	0	0	5
VGL	1	2	1	0	1	0	0	5
VMA	1	1	4	0	0	0	0	6
CVM	1	0	2	2	0	1	0	6
CVU	2	1	2	0	0	0	0	5
VNF	1	2	4	0	0	0	0	7
VPC	0	2	2	1	1	0	0	6
TOTAL	10	14	25	4	4	2	1	60

La importancia de este estudio también radica en la implementación de una prueba molecular como herramienta diagnóstica confiable y sensible. El diagnóstico de estas enfermedades en el país, está basado en frotis sanguíneos, pruebas serológicas rápidas y sintomatología clínica, Estas formas de diagnóstico, poseen limitantes importantes: el frotis sanguíneo posee baja especificidad y sensibilidad ya que solo identifica estructuras compatibles a algunos agentes y en el caso de las pruebas serológicas únicamente detecta anticuerpos, lo cual indica la exposición al agente sin discriminar entre infecciones pasadas o presentes, además poseen la desventaja de

presentar reacciones cruzadas y la falta de reacción ante la ausencia de anticuerpos en infecciones recientes (Romero, *et al.*, 2011). En relación al diagnóstico por sintomatología, este es difícil de realizar, debido a que los tres agentes encontrados presentan una sintomatología similar y el diagnóstico clínico resulta ser poco confiable ya que no solo puede causar confusión entre estos agentes sino con los de otras enfermedades en caninos (Rojas, *et al.*, 2014).

Por lo antes descrito, las técnicas moleculares representan gran utilidad por su alta sensibilidad y especificidad. Estas técnicas detectan el material genético del propio patógeno, lo que demuestra claramente la presencia del mismo en la muestra. También las infecciones latentes o tempranas pueden ser detectadas por PCR antes de que los síntomas de la enfermedad sean apreciables ya que la detección no depende de los niveles de anticuerpos (Otranto *et al.*, 2011).

Como un aporte a la presente investigación, se realizó la secuenciación de seis muestras de ADN positivas a las pruebas de PCR para *Ehrlichia canis* (5 de 6 muestras), *Babesia* spp. (1 de 6 muestras) y *Anaplasma platys* (4 de 6 muestras). Inicialmente nueve muestras fueron enviadas al Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saude Animal Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil, en donde se procedió a realizar el proceso para secuenciación, siendo posible el análisis en seis de las nueve muestras (tres muestras con resultados positivos a Babesia en el presente estudio no pudieron ser procesadas para secuenciación) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de resultados de seis muestras positivas por PCR en El Salvador y secuenciación en Brasil.

Código	Agente identificado. PCR, El Salvador	Agente identificado. Secuenciación, Brasil.
VPC110416	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
CVM110616	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Ehrlichia canis</i> *
		<i>Anaplasma platys</i>
VPC101016	<i>Ehrlichia canis</i> ,	<i>Ehrlichia canis</i> ,
	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
VSP080216	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
VSP090316	<i>Ehrlichia canis</i> ,	<i>Ehrlichia canis</i> ,
	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
VLH011017	<i>Babesia</i> spp.,	<i>Babesia canis vogeli</i> ,
	<i>Ehrlichia canis</i> ,	<i>Ehrlichia canis</i>
	<i>Anaplasma platys</i> ^Δ	

* No identificada en las pruebas de PCR realizadas en El Salvador.

^Δ Muestra no procesada para secuenciación de Brasil.

Los resultados obtenidos en Brasil concuerdan con los resultados generados en la presente investigación, permitiendo además identificar una muestra positiva de

Babesia spp. como *Babesia canis vogeli*, especie de la cual ya se tienen reportes en la región en estudios desarrollados en Nicaragua y Costa Rica (Wei *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014). Se presentó una única diferencia en una de las muestra, en la cual el presente estudio detectó *Anaplasma platys* y durante el proceso de análisis en Brasil se detectó además *Ehrlichia canis*, esto se explica debido a que en Brasil se realizó un PCR anidado previo a la secuenciación, el PCR anidado consiste en buscar una secuencia del agente dentro de una secuencia previamente obtenida por PCR y tiene la ventaja de incrementar la sensibilidad de la prueba, pudiendo detectar cargas bajas de la bacteria, por lo que se recomienda para detección de animales con presencia del agente *Ehrlichia canis* de manera subclínica (Harrus *et al.*, 1998); estas cargas bajas pueden presentarse en perros por períodos de por lo menos 34 meses (Harrus *et al.*, 1998a) sin manifestación de enfermedad. Cuando los agentes se encuentran causando enfermedad, estos están en niveles detectables por PCR convencional, por lo que puede ocurrir que el hallazgo en esta muestra se deba a la presencia subclínica de *Ehrlichia canis* en el perro del cual se obtuvo la muestra.

Los resultados obtenidos en Brasil, confirman los resultados de las pruebas de PCR realizadas en la presente investigación, demostrando que la prueba puede ser empleada para el diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. y *Anaplasma platys* en sangre de perros. Este se convierte en el primer estudio en identificar molecularmente los agentes antes mencionados y demuestra la circulación de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* y *Anaplasma platys* en perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos en el área de estudio.

Finalmente, es importante tomar en consideración que el restante 40% de las muestras que mostró resultados negativos en el estudio, puede deberse a la ausencia de los agentes patógenos y presencia de otras enfermedades infecciosas, debido a que en esta investigación todos los pacientes manifestaron síntomas clínicos y fueron muestreados bajo la sospecha de hemoparásitos; pero también la no detección puede deberse a la presencia de los mismos en cantidades bajas no detectables por la prueba, lo cual ocurre en animales afectados de forma subclínica, también la presencia de *Hepatozoon canis* puede representar un porcentaje de negatividad menor ya que no fue posible realizar su identificación.

5. CONCLUSIONES

El porcentaje de muestras positivas a hemoparásitos encontrado por la técnica de PCR en el presente estudio, fue del 60% con al menos un agente, resultados que coinciden con los porcentajes de la región Centroamericana.

En el presente estudio se encontraron al menos tres agentes, en sangre entera de perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos, identificando *Ehrlichia canis* 34%, *Babesia* spp. 17% y *Anaplasma platys* 21%.

El no hallazgo de *Hepatozoon canis* en el presente estudio no implica la ausencia del agente en las muestras analizadas, ya que deben considerarse aspectos como variaciones en la secuencia de detección del agente.

Se identificaron co-infecciones en un 10% a dos agentes *Ehrlichia-Anaplasma* 4%, *Ehrlichia-Babesia* 4% y *Anaplasma-Babesia* 2% y un 1% a tres agentes *Ehrlichia-Anaplasma-Babesia*, siendo razonable por ser enfermedades transmitidas por el mismo vector *Rhipicephalus sanguineus*.

De acuerdo al proceso de secuenciación realizada en Brasil, se confirma la utilidad de esta prueba para el diagnóstico en muestras de sangre entera de perros de nuestro país para *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. y *Anaplasma platys*.

Mediante secuenciación en una muestra positiva a *Babesia* spp., se identificó la especie *Babesia canis vogeli*, con una similitud del 100% con secuencias disponibles en el GenBank al realizar el análisis a través del BLAST.

Un 40% de muestras resultaron negativas a alguno de los agentes investigados; sin embargo, debe considerarse que estos animales presentaron sintomatología sospechosa a hemoparásitos por lo que no puede descartarse la presencia de algún agente patógeno no evaluado en el presente estudio.

Este se convierte en el primer estudio de identificación molecular en nuestro país para los agentes investigados, confirmando la presencia de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Babesia canis vogeli* en perros del área en estudio.

6. RECOMENDACIONES

Ampliar la investigación a nivel nacional para la detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Babesia spp.*, *Anaplasma platys* y *Hepatozoon canis* en sangre de perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos.

Realizar nuevos estudios de búsqueda de *Hepatozoon canis*, modificando las secuencias empleadas en el presente protocolo de PCR, para corroborar la presencia o ausencia del agente en perros de El Salvador.

Considerar en las clínicas veterinarias la presencia de co-infecciones en perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos para el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.

Se recomienda la realización de PCR en perros con sospecha de hemoparásitos como técnica diagnóstica que facilite la identificación de los diferentes agentes parasitarios en sangre.

Realizar otros estudios con la finalidad de evidenciar la presencia o ausencia de otras especies de *Babesia* distintas a *Babesia canis vogeli* en perros de El Salvador.

Considerar la existencia de otros agentes parasitarios que pueden presentar sintomatología similar, complicando su diagnóstico y tratamiento.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Atif F.A. 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitology Research*. 114:3941-3957.
- Baneth G, Mathew JS, Shkap V, Macintire DK, Barta JR, Ewing SA. 2003. Canine Hepatozoonosis: Two disease syndromes caused by separate Hepatozoon spp. *Trends in Parasitology* 19: 27-31.
- Baneth G & Vincent - Johnson N. 2005. En: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Shaw SE & Day MJ. Manson Publishing/The Veterinary Press. 78-88.
- Baneth G. 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol*, 181:3–11.
- Baneth G. 2012. Hepatozoonosis – Hepatozoon canis infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th edition. Edited by Greene CE. St. Louis: Elsevier Saunders; 750–757.
- Dantas - Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*. 3:26
- Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensulato* from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors*, 6:213.
- De Caprariis D, Dantas-Torres F, Capelli G, Mencke N, Stanneck D, Breitschwerdt EB, Otranto D. 2011. Evolution of clinical, hematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary Microbiology* 149: 206-212.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA 2001. Recognition of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and “HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J SystEvolMicrobiol* 51:2145–2165
- Gal. A; Loeb. E; Mekusas. Y; Baneth. G. 2007. Detection of Ehrlichia canis by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*. 1-6.
- Jane E. Sykes, 2014. *Canine and Feline Infectious Diseases*. ELSEVIER. Anaplasmosis, pag 290-300, Babesiosis, pag 727-738, Ehrlichiosis, pag 278-289 y Hepatozoonosis, pag 747-760, pp915.

Kledmanee. K; Suwanpakdee. S; Chatsiriwech. J; Suksai. P; Suwannachat. P; Sariya. L; Buddhirongawatr. R; Charoonrut. P; Chaichoun. K. 2009. Thailandia. Development of multiplex Polymerase chain reaction for detection of Ehrlichia canis, Babesia spp and Hepatozoon canis in canine blood. Vol.40: 1-5.

Matamala, I. 2009. Conservación de muestras clínicas (En línea). Consultado el 28 Oct. 2015. Disponible en <http://200.72.142.194/chp/chpftp/ConservacionMuestrasLaboratorio.pdf>

Martin. A; Brown. GK; Dunstan. RH; Roberts.TK. 2004. Anaplasma platy: an improved PCR for its detection in dogs. Experimental parasitology.109:176-180.

Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa M, Stanneck D, Decaprarriis D, Capelli G, Baneth G. 2011. Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR. Parasites & Vectors 4: 55.

OIE (Organización mundial de sanidad animal)/ Institute for International Cooperation in Animal Biologics, *An OIE Collaborating Center, Iowa State University, College of Veterinary Medicine*. 2005. (en línea). Consultado el 1 Oct. 2015.

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

Romero, Meneses, Salazar, Jimenez, Romero, Aguiar, Labruna, Dolz. 2011. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Costa Rica. America Central. Vol 91:95-97.

Santamaria. A, Calzada. JE, Saldaña. A, Yabsley. MJ, Gottdenker. NL. 2014. Molecular diagnosis and species identification of Ehrlichia and Anaplasma infections in dogs from Panama, Central America. Vector borne and zoonotic diseases 14(5):368-70

Taylor M.A, Coop R.L, Wall R.L. 2016. Parasites of dogs and cats. Veterinary parasitology 12: 48-54.

Wei. L; Kelly. P; Ackerson. K, Zhang. J, El-Mahallawy. HS, Kaltenboeck. B, Wang. 2014. First report of Babesia gibsoni in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. Parasites & vectors 7:26.

8. ANEXOS

(A-1) Encuesta para la determinación de Hemoparásitos en la especie canina.

Fecha: ____/____/____

Nombre _____ Clínica _____
Veterinaria: _____

Datos Generales del Lugar

Dirección:

Teléfono:

Correo Electrónico:

Persona de contacto:

Datos acerca de la enfermedad:

¿Breve Introducción a cerca de los hemoparásitos?

¿Síntomas más comunes de esta enfermedad?

¿Garrapatas? ¿Cuál es la influencia de estos ectoparásitos?

¿Cuáles son las Pruebas de diagnóstico que realizamos ante la sospecha de esos síntomas?

¿Cantidad de casos que llegan semanalmente?

¿Cuántos de estos casos son confirmados?

*¿Qué sabe de anaplasma y babesia?

¿Con que pruebas de laboratorio las diagnostica?

(A-2) FICHA GENERAL DEL PACIENTE.

Nombre del propietario: _____

Contacto: _____

Dirección de residencia: _____

Identificación del paciente:

Nombre: _____

Sexo: _____

Edad: _____

Raza: _____

Síntomas que presenta:

Resultados HEMATOLOGICOS:

(A-3) HOJA DE CONSENTIMIENTO.

Fecha: _____

Por este medio yo:

Con numero de DUI _____ Autorizo la obtención de la muestra sanguínea de mi mascota para el uso de investigación en enfermedades de caninos.

FIRMA.

Cuadro A- 1. Resultados obtenidos por clinicas veterinarias.

VETERINARIA LOS HEROES	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	2
A. PLATYS	0
BABESIA SPP	2
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	2
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	1
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	7

VETERINARIA LOS HEROES LA SULTANA	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	4
A. PLATYS	-
BABESIA SPP	2
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	1
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	7

VETERINARIA GEOVANI DE LETRAN	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	1
A. PLATYS	1
BABESIA SPP	2
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	1
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	5

MEDIVET	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	2
A. PLATYS	1
BABESIA SPP	-
E. CANIS + A. PLATYS	2
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	1
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	6

VETERINARIA SUPER PET	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	2
A. PLATYS	2
BABESIA SPP	1
E. CANIS + A. PLATYS	1
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	6

VETERINARIA PETS PARADISE	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	2
A. PLATYS	2
BABESIA SPP	1
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	5

CLINICA VETERINARIA UES	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	2
A. PLATYS	2
BABESIA SPP	1
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	5

CLINICA VETERINARIA MARIA AUXILIADORA	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	4
A. PLATYS	1
BABESIA SPP	1
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-
TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	6

VETERINARIA NARICES FRIAS	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	4
A. PLATYS	1
BABESIA SPP	2
E. CANIS + A. PLATYS	-
E. CANIS + BABESIA SPP	-
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-

VETERINARIA POLICLINICA	
MUESTRAS POSITIVAS	
E. CANIS	2
A. PLATYS	-
BABESIA SPP	2
E. CANIS + A. PLATYS	1
E. CANIS + BABESIA SPP	1
A. PLATYS + BABESIA SPP	-
E. CANIS + A.. PLATYS + BABESIA SPP	-



Figura A- 1. Proceso de extracción de ADN de muestras sanguíneas de perros con el uso de Kit Comercial “High pure PCR template preparatio”.



Figura A- 2. Proceso de amplificación por medio de PCR y elaboración de gel de electroforesis.

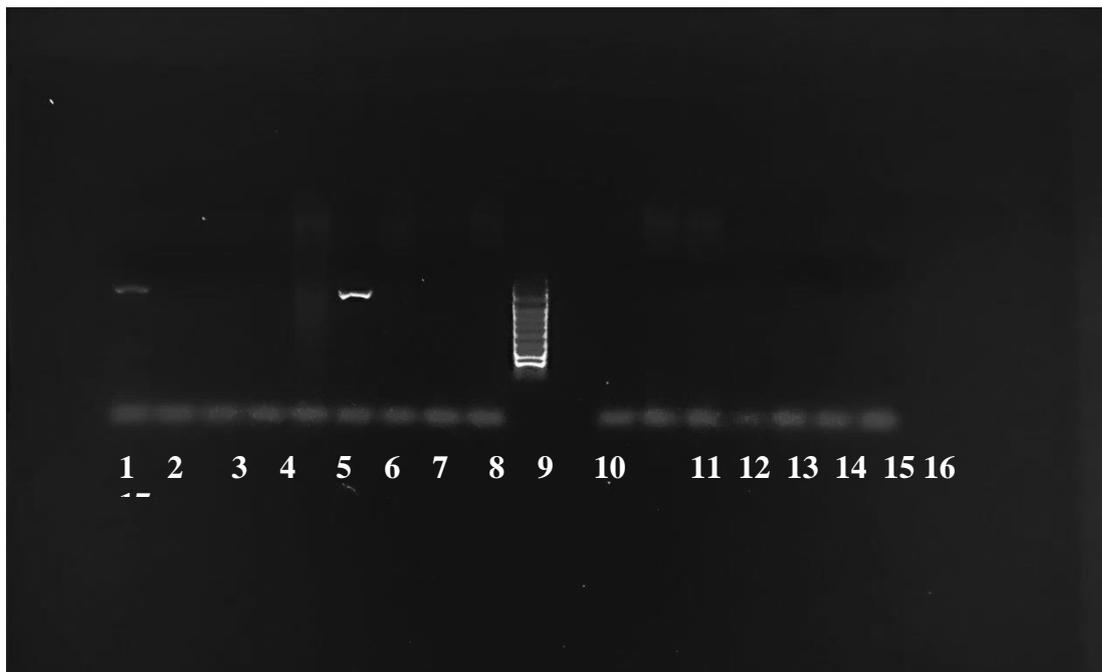


Figura A- 3. PCR para la detección de *Anaplasma platys*.

Carril 1-9 y 11-17: Amplificación de ADN de 16 muestras sanguíneas de perros.

Carril 10: Marcador de peso molecular.

Carril 1 y 6: Muestras positivas a *Anaplasma platys* (678 pb).

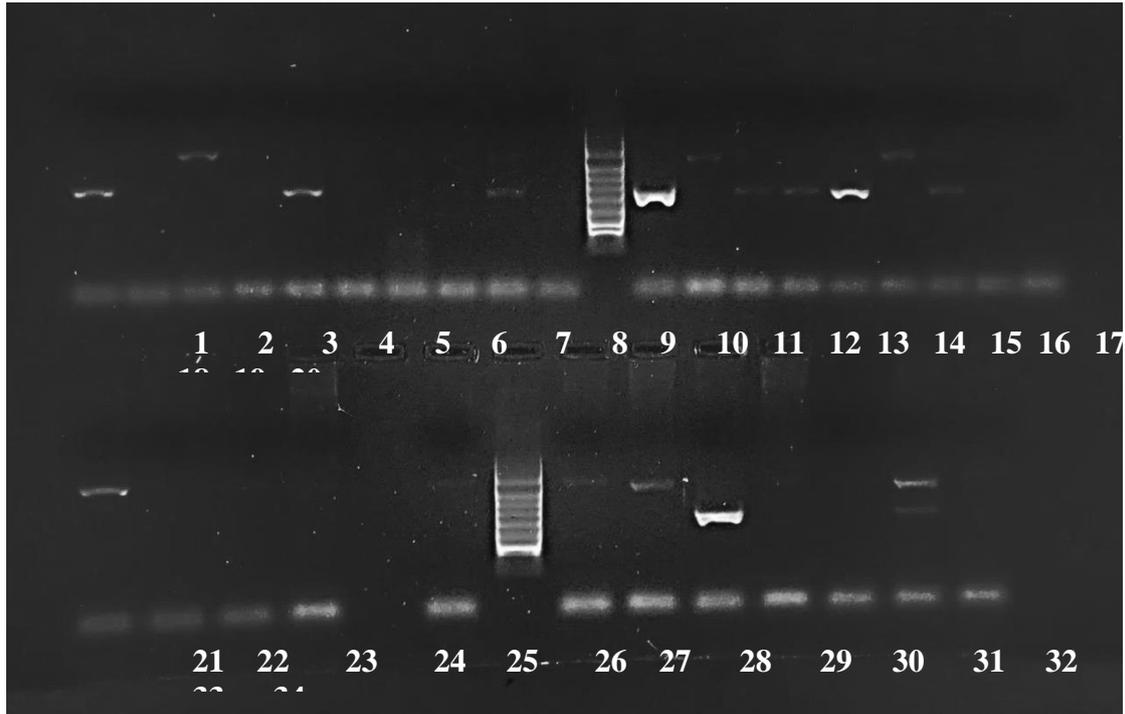


Figura A- 4. PCR multiplex para la detección de *Ehrlichia canis*, *Babesia spp* y *Hepatozoon canis*.

Carril 1-10, 12-26 y 28-34: Amplificación de ADN de 32 muestras sanguíneas de perros.

Carril 11 y 27: Marcador de peso molecular.

Carril 25: Muestras

Carril 1, 4, 5, 9, 12, 14, 15, 16, 18, 30 y 33 muestras positivas a *Ehrlichia canis* (380pb).

Carril 3, 13, 17, 21, 26, 28, 29 y 33 muestras positivas a *Babesia spp.* (619pb).