



**Identificación y caracterización molecular de *Anaplasma platys* en caninos del albergue
“Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas.**

Dela Campos, Génesis Katherine

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura


Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología


Reyna Bello, Armando Ph.D.

02 de Marzo del 2022

Reporte de verificación de contenido




Trabajo de titulación_Reporte de verificación de contenido ...
Scanned on: 15:22 March 2, 2022 UTC




0.3%

Over all Similarity Score



8

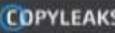
Results Found



10533

Total Words in Text

Similarity Score	Count
Identical Words	24
Words with Minor Changes	5
Paraphrased Words	6
Orignal Words	1189



Trabajo de titulación_Reporte de verificación ... Scanned on: 15:22 March 2, 2022 UTC

Results

The results contain any sources we have found that include words with identical, minor changes, and paraphrased text to your submitted document.

Source	Similarity Score	Matched Content
Epidemiology, Diagnosis, and Control of Canine Infectious E...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
Low genetic diversity of Ehrlichia canis associated with high...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
Veterinary Sciences Free Full Text Epidemiology, Diagn...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
Molecular detection and characterization of Anaplasma pla...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
(PDF) Detection of Anaplasma platys in dogs and Rhipiceph...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
Regeneración Institucional Covid-19: Polimerosio del CYP2D6 ...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
Polimerosio del CYP2D6 en mamíferos marinos de origen...	High	Identical matches are not recommended for reuse.
Polimerosio del CYP2D6 en mamíferos marinos de origen...	High	Identical matches are not recommended for reuse.



Trabajo de titulación_Reporte de verificación ... Scanned on: 15:22 March 2, 2022 UTC

Scanned Text

Your text is highlighted according to the matched content in the results above.

Identical Words Paraphrased Words Original Words

Resumen

La anaplasmosis canina es una infección provocada por Anaplasma platys, una bacteria del reino protista capaz de causar la enfermedad en perros domésticos. En algunas ocasiones puede afectar otros miembros de la familia canina. El principal vector de la enfermedad lo constituyen los garrapatas maromas del género Rhipicephalus. Actualmente, esta distribución geográfica ha incrementado el número de casos reportados en toda Latinoamérica, pero especialmente en países con clima tropical y subtropical, entre los cuales se encuentran Ecuador. Por tanto, durante el presente estudio se realizó la primera vez de diagnóstico en 100 muestras de sangre total obtenidas de perros pertenecientes de refugios en Santo Domingo y Chimbo, a una clínica veterinaria en Balba (SA, 22 y 25 respectivamente). Se empleó el diagnóstico de rutina con el método de la tinción de Wright-Giemsa y se realizó un análisis de PCR. El estudio de los resultados se determinó una prevalencia del 5% para las muestras de sangre. Chimbo y Balba se que ninguna muestra a fin positivo para A. platys. Debido a que en el refugio de Chimbo, se determinó una prevalencia del 5% de los perros que presentaron infección con la bacteria, además, se identificó que los otros albergados con otro porcentaje de control genético positivo. Se concluye que la alta prevalencia que se detectó en el sector San Juan de los Rios, como resultado del estudio, aunque se determinó dentro de un rango de edad y sexo, no se realizó una correlación que vincule a estos factores con la enfermedad, ya que la literatura indica que no son determinantes para el diagnóstico de anaplasmosis. Debido a que se logró establecer la presencia del patógeno dentro de uno de los albergados, se concluye la existencia tanto de la enfermedad como del vector en el país, además, no se descarta la posibilidad de encontrar casos positivos



Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO. Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, ou=SECURITY DATA S.A., postalCode=DE CERTIFICACION DE INFORMACION, serialNumber=290620182334, cn=ARMANDO REYNA BELLO. Fecha: 2022.03.02 13:05:24 -05'00'

REYNA BELLO ARMANDO PhD
DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, "**Identificación y caracterización molecular de *Anaplasma platys* en caninos del albergue "Narices Frías" de Santo Domingo de los Tsáchilas** " fue realizado por la señorita **Dela Campos, Génesis Katherine** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 02 Marzo 2022

Firmado digitalmente por ARMANDO
REYNA BELLO
Nombre de reconocimiento (DN):
c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION,
serialNumber=290620182334,
cn=ARMANDO REYNA BELLO
Fecha: 2022.03.02 13:05:40 -05'00'

Reyna Bello, Armandó

C. C 1758891830



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Dela Campos, Génesis Katherine**, con cédula de ciudadanía n° 2350227381, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Identificación y caracterización molecular de *Anaplasma platys* en caninos del albergue "Narices Frías" de Santo Domingo de los Tsáchilas** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 02 Marzo 2022

Dela Campos, Génesis Katherine

C.C.: 2350227381



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Dela Campos, Génesis Katherine**, con cédula de ciudadanía n° 2350227381, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Identificación y caracterización molecular de Anaplasma platys en caninos del albergue "Narices Frías" de Santo Domingo de los Tsáchilas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 02 Marzo 2022

Dela Campos, Génesis Katherine

C.C.: 2350227381

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todos los animalitos que son parte de la fauna urbana y silvestre del mundo entero. A todos los perros callejeros que se han cruzado en mis días, a todos los animales abandonados y maltratados por los cuales he levantado la voz para reclamar sus derechos y por los cuales lo seguiré haciendo.

A todas mis mascotas que me enseñaron a ver la pureza en los ojos de los demás.

A todos los animales que he visto cruzar el arco iris.

A cada ser vivo que ha llegado a mi vida para dejarme enseñanzas, para contarme historias y compartirme de su tiempo aunque fueran instantes.

Génesis Dela

Agradecimientos

Estoy inmensamente agradecida con la vida, con toda mi familia, mis ancestros de donde provengo, mi núcleo que son mamá, papá, hermanos y mascotas, quienes me han enseñado a ver lo mejor en cada momento, a nunca rendirme y a entender que cada día puedo sumarle un extra a mi felicidad.

Agradezco a mi tutor de tesis Dr Armando Reyna por su mentoría académica durante toda la carrera e integración curricular, por su motivación y contribución en la investigación, a las doctoras veterinarias que nos colaboraron con los diferentes muestreos Génesis Rosero, Brenda Toala y Karolina López.

También a todos mis compañeros y amigos de carrera, Jessica Lapo, Ángela Verduga, Briggith Uribe, Jordan Sarango, Kevin Cando, Boris Torres, Sonia Dávila y Hugo Andrade quienes me han brindado su ayuda y amistad durante esta etapa Universitaria.

A mis demás amigos tanto dentro y fuera de la Universidad, siempre agradecida de contar con ustedes.

Gracias también a las personas que conforman el voluntariado de Protección Animal SD, del Refugio Municipal y a la señora Dolores encargada del albergue para mascotas en Chone, por darme la oportunidad de aportar a través de este estudio con la sanidad animal de las mascotas rescatadas.

Génesis Dela

Índice de contenido

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Listado de figuras.....	10
Listado de tablas.....	11
Lista de abreviaturas.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
1.1. Formulación del problema.....	15
1.2. Justificación.....	16
1.3. Objetivos del proyecto.....	17
1.3.1 Objetivo general.....	17
1.3.2 Objetivo específico.....	17
Capítulo II: Marco teórico.....	18
2.1. Generalidades.....	18
2.2. <i>Anaplasma platys</i>	18
2.3. Vectores.....	20
2.4. Taxonomía.....	21
2.5. Transmisión.....	22
2.6. Distribución.....	23
2.7. Signos clínicos y patogénesis.....	25
2.8. Respuesta inmunitaria.....	26
2.9. Diagnóstico.....	26
2.9.1. Diagnóstico directo.....	27
2.9.2. Serología.....	27
2.9.2.1. Inmunofluorescencia (IFA).....	27
2.9.2.2. Elisa Snap 4Dx.....	28

2.9.2.3. Inmunocromatografía.....	28
2.9.3. Diagnóstico molecular.....	28
2.9.3.1 PCR (Reacción en cadena de polimerasa).....	28
2.9.3.2 LAMP (Amplificación isotérmica mediada por loops)	29
2.9.3.3 RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica)	29
2.10. Tratamiento y control.....	30
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	31
3.1. Toma de muestras	31
3.2. Extracción de sangre total	31
3.3. Frotis sanguíneos.....	31
3.4. Tinción Giemsa	32
3.5. Identificación microscópica	32
3.6. Extracción de ADN total.....	32
3.7. Verificación del ADN extraído	34
3.8. Controles positivos de <i>Anaplasma marginale</i>	34
3.9. PCR convencional para la detección de <i>Rickettsias</i>	34
3.10. Diferenciación de especies del orden <i>Rickettias</i> mediante RFLP.....	36
3.11. Análisis estadístico	37
3.11.1. Diseño no experimental.....	37
3.11.2. Variable de respuesta.....	38
3.11.3. Análisis	38
3.11.4. Estadística descriptiva	38
3.11.5. Datos de prevalencia	38
Capítulo IV: Resultados y Discusión	39
4.1. Distribución por sexo de los muestreos.....	39
4.2. Presencia de vectores.....	40
4.3. Frotis sanguíneos.....	43
4.4. ADN extraído.....	46
4.5. Estandarización de PCR para la identificación de <i>Rickettsias</i>	47
4.6. PCR convencional para <i>Anaplasma platys</i> y <i>Ehrlichia canis</i>	48
4.7. Enzimas de restricción para identificar <i>Anaplasma platys</i>	50
4.8. Prevalencia de <i>Anaplasma platys</i> en los refugios.....	53
Capítulo V: Conclusiones	57
Capítulo VI: Recomendaciones	59
Capítulo VII: Bibliografía	60

Listado de figuras

Figura 1 Frotis de <i>Anaplasma platys</i>	19
Figura 2 Taxonomía de <i>Anaplasma platys</i>	22
Figura 3 Distribución mundial de <i>Anaplasma platys</i>	24
Figura 4 Sexo de los canes muestreados en refugio Narices frías	39
Figura 5 Sexo de los canes muestreados en refugio de Chone.....	40
Figura 6 Canes en contacto con garrapatas dentro del refugio Narices Frías.....	41
Figura 7 Canes en contacto con garrapatas dentro del refugio de Chone.....	42
Figura 8 Frotis sanguíneo de la muestra 67.....	44
Figura 9 Frotis sanguíneo de la muestra 75.....	45
Figura 10 ADN extraído a partir de la sangre total de los canes.	46
Figura 11 Estandarización de la condiciones para PCR de <i>Rickettsias</i>	47
Figura 12 PCR para identificación del género <i>Anaplasma</i>	49
Figura 13 Digestión con HindIII en muestras positivas.....	51
Figura 14 RFLP obtenidos con el corte de HindIII.	52
Figura 15 Prevalencia de <i>A. platys</i> dentro del estudio.....	55

Listado de tablas

Tabla 1	Dosis recomendada para el tratamiento de infecciones por <i>A. platys</i>	30
Tabla 2	Protocolo para la extracción de ADN en sangre.	33
Tabla 3	Cebadores para la amplificación de <i>Anaplasma</i>	35
Tabla 4	Concentración de reactivos para la PCR de <i>Anaplasma</i>	35
Tabla 5	Condiciones para la amplificación de PCR para <i>Anaplasma</i>	36
Tabla 6	Condiciones para master mix de enzima HindIII.....	37
Tabla 7	Muestras evaluadas en frotis sanguíneos.	43
Tabla 8	Muestras positivas para <i>A. platys</i>	53

Lista de abreviaturas

TCC	Trombocitopenia cíclica canina
DC	Células de núcleo denso
RC	Células reticuladas
CVBD	Enfermedad transmitida por vectores acompañantes
CBC	Conteo completo de células sanguíneas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IFA	Inmunofluorescencia
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por loopS
μL	Microlitro
μm	Micromolar
mM	Milimolar
pb	Pares de base
U/μL	Unidades por microlitro
ng/UI	Nanogramos por microlitro

Resumen

La anaplasmosis canina es una infección provocada por *Anaplasma platys*, una bacteria intraplaqueatrica capaz de ocasionar la trombocitopenia cíclica canina, aunque en ocasiones puede infectar otros mamíferos e incluso humanos. El principal vector de la enfermedad lo constituyen las garrapatas marrones del perro *Rhipicephalus sanguineus*, cuya distribución cosmopolita ha incrementado el número de casos positivos en toda Latinoamérica, pero especialmente en países con climas tropicales y subtropicales, entre los cuales se encuentra Ecuador. Por tanto, durante el presente estudio se evaluó la presencia de *A. platys* en 102 muestras de sangre total obtenida de caninos provenientes de refugios en Santo Domingo, Chone, y una clínica veterinaria de Bahía (54, 22 y 26 respectivamente). Se empleó el diagnóstico directo con microscopia óptica de frotis sanguíneos, análisis molecular con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica). Entre los resultados se determinó una prevalencia del 0% para Santo Domingo y Bahía, ya que ninguna muestra fue positiva para *A. platys*, mientras que en el refugio de Chone, se determinó una prevalencia del 31,81% que representa 7/ 22 perros infectados, además, se identificó que los dos albergues existe un alto porcentaje de contacto garrapata-perro, lo que deja en claro la alta exposición que sufren los animales al vector tanto fuera como dentro del refugio, debido a las pocas medidas de control sanitario que existe en el Ecuador para regular la propagación de estos ectoparásitos.

- **ANAPLASMA PLATYS**
- **RIPHICEPHALUS SANGUINEOUS**
- **TROMBOCITOPENIA CÍCLICA**
- **ZOONOSIS**

Abstract

Canine anaplasmosis is an infection caused by *Anaplasma platys*, an intraplachetria bacterium capable of causing canine cyclic thrombocytopenia, although it can occasionally infect other mammals and even humans. The main vector of the disease is the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*, whose cosmopolitan distribution has increased the number of positive cases throughout Latin America, but especially in countries with tropical and subtropical climates, including Ecuador. Therefore, during the present study, the presence of *A. platys* was evaluated in 102 whole blood samples obtained from canines from shelters in Santo Domingo, Chone, and a veterinary clinic in Bahía (54, 22, and 26, respectively). Direct diagnosis was used with light microscopy of blood smears, molecular analysis with PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Among the results, a prevalence of 0% was determined for Santo Domingo and Bahía, since no sample was positive for *A. platys*, while in the Chone refuge, a prevalence of 31.81% was determined, which represents 7/22 dogs. infected, in addition, it was identified that the two shelters have a high percentage of tick-dog contact, which makes clear the high exposure that animals suffer to the vector both outside and inside the shelter, due to the few sanitary control measures that exists in Ecuador to regulate the propagation of these ectoparasites.

- **ANAPLASMA PLATYS**
- **RIPHICEPHALUS SANGUINEOUS**
- **CYCLIC THROMBOCYTOPENIA**
- **ZOONOSIS**

Capítulo I: Introducción

1.1. Formulación del problema

La anaplasmosis canina se considera una enfermedad de alto interés veterinario y médico que afecta principalmente a perros en todo el mundo, sin embargo, existen reportes de contagio en gatos y humanos. La infección es transmitida por vectores que sirven como hospedadores de las bacterias Gram-negativas. Este hemotrópico intracelular del género *Anaplasma* y especie *Anaplasma platys* (*A. platys*), tiene la capacidad de invadir las células sanguíneas y ocasionar la disminución del número de plaquetas en la sangre del animal infectado (Atif et al., 2021).

El cuadro infeccioso en los caninos recibe el nombre de trombocitopenia cíclica canina infecciosa, y se trasmite de un hospedador a otro a través de la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*). Gracias a este vector cosmopolita, la anaplasmosis canina ha sido detectada en todos los continentes, pero se considera potencialmente endémica en solo cuarenta y tres países, además, la estimación de contagios en humanos, ha determinado que la enfermedad es de carácter zoonótico (Ybañez et al., 2016; Arraga-Alvarado et al., 2014).

La presencia de garrapatas *R. sanguineus* en zonas tropicales y subtropicales, ha permitido que gran parte de los países latinoamericanos presenten cada vez una mayor incidencia de anaplasmosis canina, ya que Latinoamérica es una región con déficit en la tenencia responsable de mascotas y control de vectores infecciosos como las garrapatas (Maggi & Krämer, 2019). Según Eiras et al., (2013) se ha identificado *A. platys* en perros muestrados de comunidades en Chile, Venezuela y Brasil, sin descartar la posibilidad de transmisión zoonótica, ya que las personas de varias localidades conviven con canes infectados de estos vectores.

En Ecuador, un país de Latinoamérica con clima tropical, no se han reportado oficialmente casos de infecciones provocadas por *A. platys* en caninos, más que en la región Insular, aunque exista la prevalencia de *R. sanguineus* en varias regiones del país (Jimenez et al., 2020).

En las ciudades de Santo Domingo, Chone y Bahía, los voluntarios de los albergues caninos reportan la evidencia de signos clínicos dentro de las instalaciones (comunicación personal), que podrían resultar positivos para *A. platys*, debido a las condiciones de abandono prolongado y contacto directo con las garrapatas que han sufrido los perros que llegan a estos centros de acopio.

1.2. Justificación

La anaplasmosis canina se está convirtiendo cada vez más en una enfermedad de alto interés investigativo en toda Latinoamérica, ya que los factores climáticos y sociales en torno a la falta de responsabilidad en el cuidado de mascotas, han conllevado a que la incidencia de *A. platys* aumente significativamente en el continente durante los últimos años (Maggi & Krämer, 2019). Los síntomas que presentan los canes infectados van desde fiebre, pérdida de peso, anorexia, letargo, mucosas pálidas, uveítis bilateral, secreción nasal, epistaxis hasta linfadenomegalia e incluso la muerte del animal, si no hay tratamiento previo (Atif et al., 2021). También cabe recalcar, que el CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades) informó que después del primer caso de *A. platys* en humanos en 1992, la infección ha sido propagada, presentándose al menos 5655 nuevos casos hasta el 2019 en toda América, lo que intensifica la necesidad de llevar a cabo estudios de detección y control del patógeno en el mayor número de países donde aún no existen reportes (Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

El gran potencial zoonótico que tiene *A. platys* y la falta de información acerca de anaplasmosis canina en el Ecuador, impulsa a la realización de investigaciones para determinar la presencia o no del patógeno en varias zonas del país de clima cálido como Santo Domingo de los Tsáchilas, Chone, y Bahía de manera que se puedan obtener datos actualizados de la prevalencia de la enfermedad en esta provincia, y así, precautelar el bienestar sanitario de los animales, incrementar el control de los vectores y poder disminuir la potencialidad zoonótica de esta enfermedad.

1.3. Objetivos del proyecto

1.3.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente *Anaplasma platys* en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas.

1.3.2 Objetivo específico

Determinar la presencia de *Anaplasma platys* mediante frotis sanguíneos.

Caracterizar molecularmente *Anaplasma platys* en caninos provenientes del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Analizar y construir mediante herramientas bioinformáticas el árbol filogenético de las muestras positivas para *Anaplasma platys*.

Capítulo II: Marco teórico

2.1. Generalidades

La anaplasmosis canina es una enfermedad virulenta no contagiosa que se transmite por garrapatas, las cuales son los principales vectores de las bacterias del género *Anaplasmataceae*, responsables de ocasionar dicha afección tanto en animales como humanos (Bakken & Dumler, 2010; Atif et al., 2021).

El género *Anaplasma* comprende bacterias patógenas Gram negativas intracelulares obligatorias, y tienen la capacidad de infectar y reproducirse en el interior de algunas células sanguíneas como plaquetas, eritrocitos y algunos glóbulos blancos. Dentro de su clasificación, se puede encontrar algunas especies como *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*, que infectan distintos mamíferos (Rar et al., 2021).

Al igual que otras enfermedades transmitidas por garrapatas, la anaplasmosis canina causa signos clínicos como fiebre, malestar general, secreción nasal, pérdida de peso, linfadenomegalia, entre otros síntomas (McFee, 2018). La primera vez que se describió *A. platys* fue en la publicación de Harvey et al., (1978) donde se identificó al agente causante de la trombocitopenia cíclica canina infecciosa en un perro de Florida, Estado Unidos, el cual había estado en contacto con garrapatas, posterior a ello, se informó que el principal vector de la anaplasmosis canina era *Rhipicephalus sanguineus* y que además, la bacteria podía infectar humanos (El Hamiani Khatat et al., 2021).

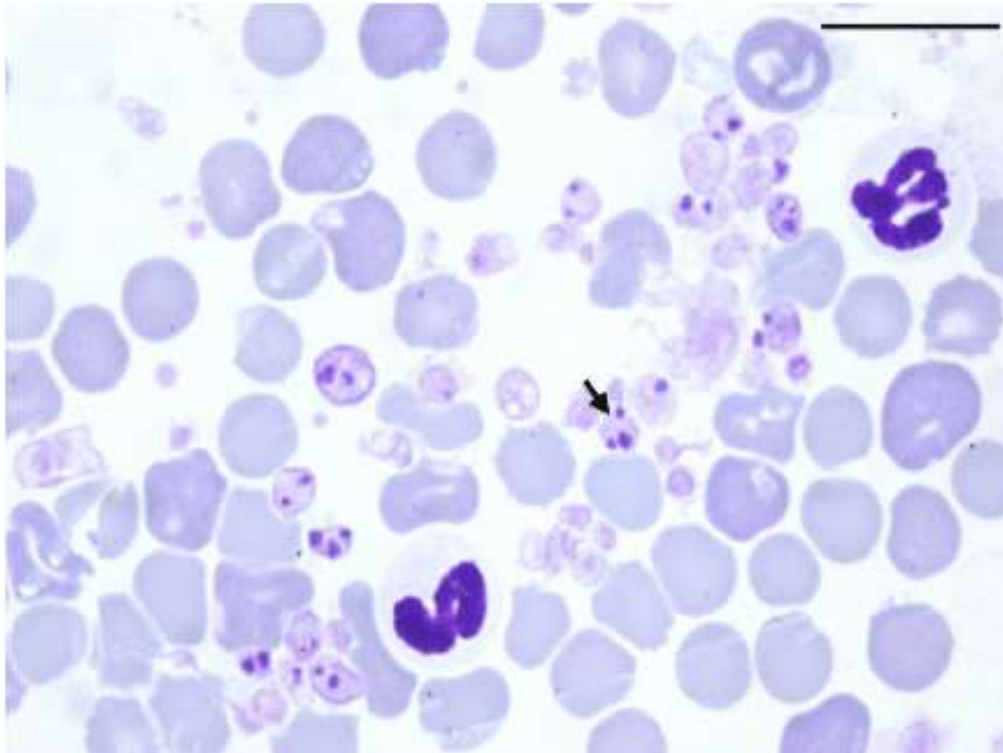
2.2. *Anaplasma platys*

Anaplasma platys es una bacteria intracelular Gram negativa, que hasta el momento se la conoce como el único agente capaz de infectar específicamente las plaquetas de un organismo, se transmite por garrapatas y ocasiona la trombocitopenia

cíclica infecciosa en perros, sin embargo, también ha sido reportada en gatos y humanos, produciendo las mismas afecciones (Valenciano et al., 2014).

Figura 1

Frotis de Anaplasma platys



Nota. Adaptado de “Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR” (p.2), por Nascimento Ramos et al., 2014, *Veterinary Parasitology*, 205 (1-2).

Las bacterias de *A. platys* presentan una estructura que varía de 350 a 1250 nm de diámetro, son de forma redondeada poco definida, semejante a un frijol y tienen una doble membrana celular, dentro de las plaquetas, los microorganismos aparecen como un grupo de inclusiones, pues tal parece, primero se adhieren a la célula plaquetaria y

después ingresan en ella a través de endocitosis, una vez que parasitan las plaquetas, se reproducen por fisión binaria dentro de vacuolas y forman mórulas (Harvey J. W., 2012).

Los microorganismos *A. platys* se pueden apreciar en el microscopio al teñir un frotis de sangre con reactivos de Giemsa, Wright o azul de metileno como se observa en la figura 1, ya que dentro de las plaquetas infectadas, las inclusiones del patógeno se colorean de azul-negro, siendo fáciles de identificar, no obstante, cualquier tipo de tinción requerirá un prueba de diagnóstico que determine el estadio de la enfermedad (Harvey, 2012; Valenciano et al., 2014).

2.3. Vectores

Uno de los principales vectores que ha contribuido a la propagación de patógenos a nivel mundial son las garrapatas, según Rymaszewska & Grenda (2008) la anaplasmosis es una enfermedad típica de transmisión por ectoparásitos, por lo que es considerada una CVBD (enfermedad transmitida por vectores de compañía).

El hecho de reconocer a la especie *Rhipicephalus sanguineus* como principal vector de la enfermedad, ha sido evidenciada por Cardoso et al., (2020) puesto que durante una investigación en Europa, se encontró *A. platys* en una hembra de *R. sanguineus* que parasitaba un canino, además, se sabe que este ectoparásito tiene una alta especificidad a un solo huésped, los caninos, por lo que es comúnmente llamada como la garrapata marrón del perro.

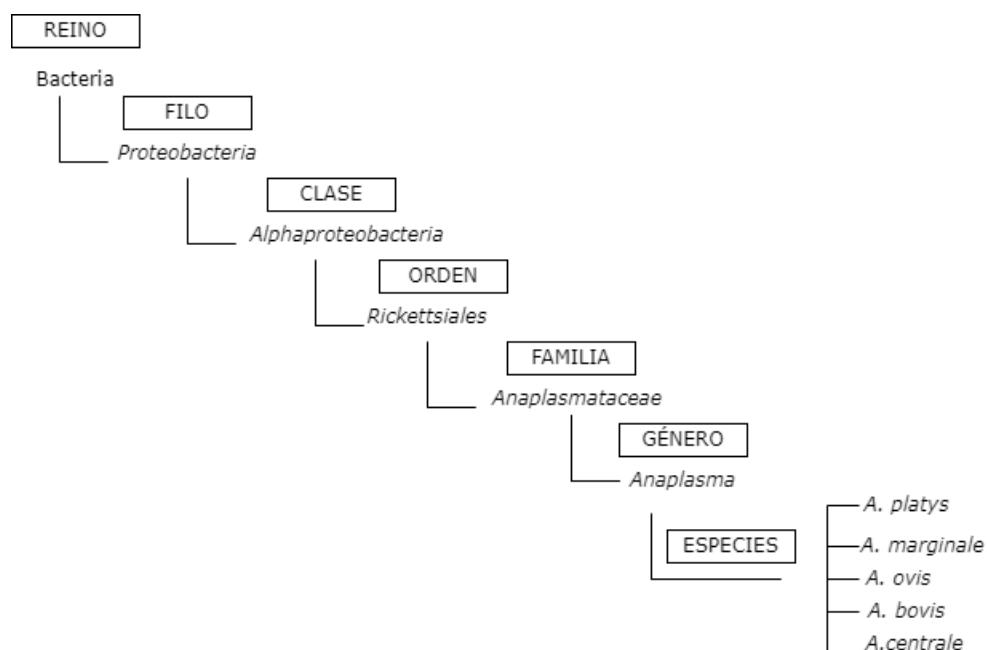
La presencia del vector ha sido establecida en todas las regiones del mundo, por lo que se considera cosmopolita, sin embargo, existe mayor prevalencia en lugares con climas tropicales y subtropicales, dentro de los cuales se encuentra Ecuador (Rivadeneira-Barreiro et al., 2021; Jimenez et al., 2020).

Las *R. sanguineus* son de color marrón rojizo y cuerpo alargado, se desarrollan en tres anfitriones distintos de los cuales el ser humano puede ser uno accidental, no obstante, cabe recalcar que el comportamiento de las garrapatas se ve influenciado por los ritmos estacionales y ciclos diurnos de las poblaciones, por lo que la temperatura y humedad influenciarán en determinar los huéspedes potenciales para la misma (Rymaszewska & Grenda, 2008).

2.4. Taxonomía

La familia *Anaplasmataceae* se encuentra incluida en el Orden de bacterias *Rickettsiales*, las cuales se caracterizan por tener un tropismo particular hacia las células sanguíneas y utilizar un huésped intermediario como las garrapatas para llegar al organismo definitivo (Dumler et al., 2001).

En principio, las *Anaplasmataceae* eran nombradas y clasificadas acorde a su patogenia, por lo que existían solo tres especies de *Anaplasma*; *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*, sin embargo, Dumler et al., (2001) reorganizaron la clasificación taxonómica de todo el orden *Rickettsiales*, basándose en análisis filogenéticos de 16S y el gen groESL, lo que dio como resultado la modificación de la familia preexistente *Ehrlichaceae*, de manera que al género *Anaplasma* le fueron asignadas dos especies más, *A. bovis* y *A. platys* que antes eran llamadas *Ehrlichia bovis* y *Ehrlichia platys* respectivamente. A continuación se muestra la clasificación filogenética de *A. platys* en la Figura 2.

Figura 2*Taxonomía de Anaplasma platys*

Nota. Los análisis filogenéticos basados en los genes 16S y groESL realizado por Dumler et al., (2001) posicionaron a *A. platys* dentro de la familia *Anaplasmataceae*.

2.5. Transmisión

De momento, el ciclo infeccioso por *A. platys* y su posterior desarrollo, no se ha descrito con exactitud, sin embargo, según la literatura, la infección por *A. platys* se produce una vez que el vector *R. sanguineus* pica al mamífero e inyecta saliva contaminada con la bacteria, tanto las formas adultas como larvas y ninfas, son capaces de transmitir el patógeno si han sido hospedadoras del mismo, ya que algunos reportes apuntan a que entre garrapatas puede haber una transmisión vertical de madre a cría (Cardoso et al., 2020).

Una vez que *A. platys* ingresa al organismo, empieza a infectar las plaquetas y adopta dos formas morfológicamente distintas que se van definiendo acorde al tiempo de

infección; después de las primeras 24 horas posterior al contagio, aparecen células de núcleo denso (DC) que miden entre 0,4 y 0,6 μm y están cargadas de cromatina densa en electrones, lo que les permite adherirse e internalizarse en las unidades plaquetarias, alrededor de las 48 horas post-infección empieza a predominar una forma celular reticulada (RC), que será la encargada de reproducirse por fisión binaria y formar las mórulas características que se observan en las plaquetas infectadas, por último, al cabo de 72 horas, las formas RC maduran nuevamente a DC para comenzar un nuevo ciclo (Cardoso et al., 2020; Bakken & Dumler, 2010).

De esta manera, *A. platys* infecta las plaquetas y produce la trombocitopenia cíclica infecciosa en perros, la gravedad de la enfermedad se verá influenciada por otros factores relacionados al huésped que determinarán si la infección pasa de un estado agudo a crónico (Atif et al., 2021).

2.6. Distribución

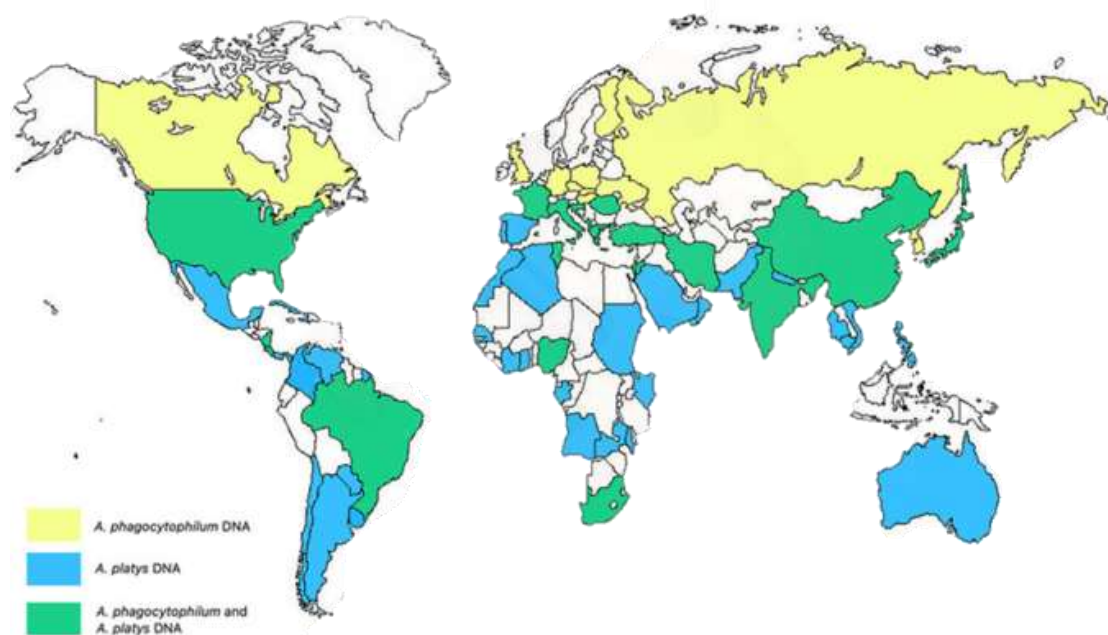
Se considera que la distribución de *A. platys* es a nivel mundial como se observa en la Figura 3, ya que existen reportes de al menos un caso en todos los continentes, no obstante, los informes revelan que generalmente se encuentra presente en regiones tropicales y subtropicales, debido a que estos climas facilitan la sobrevivencia de *R. sanguineus*, la cual se asume es su principal vector, sin embargo, según Sykes & Foley (2013) también se ha encontrado ADN de *A. platys* en garraptas *Dermacentor auratus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Haemaphysalis spp* e *Ixodes nipponensis* en diferentes países asiáticos.

El Hamiani Khatat et al., (2021) mencionan que *A. platys* es frecuente al sur de los Estados Unidos, África, la zona del mediterráneo incluido el sur de Europa y Asia, además, que las tasas más altas de infección por *A. platys* fueron detectadas en Italia,

con una prevalencia de casi el 58% al sur del país. Por otro lado, Maggi & Krämer (2019) realizaron sus aportes describiendo que la anaplasmosis al ser una CVBD, se encuentra distribuida en toda Latinoamérica, ya que debido a las condiciones decadentes e irresponsables en la tenencia de mascotas, los caninos se han convertido en centinelas de enfermedades en varios países como Argentina, Venezuela, Colombia, Brasil, Chile, El Caribe y Uruguay, donde existen reportes oficiales de contagio entre perros y posible zoonosis.

Figura 3

Distribución mundial de Anaplasma platys



Nota. Adaptado de “Anaplasma spp in dogs: Is there a danger for humans?” (p.5), por El Hamiani Khatat, et al, 2021, Revue Vétérinaire Clinique, 56(4).

2.7. Signos clínicos y patogénesis

Anaplasma platys ingresa a las plaquetas del huésped canino mediante endocitosis y se replica por fisión binaria, produciendo mórulas que pueden ser identificadas en la sangre posterior a los 10-14 días de la transmisión (De Tommasi et al., 2014). La presencia de *A. platys* en los caninos provoca un cuadro de trombocitopenia cíclica infecciosa (TCC) que generalmente viene acompañada de signos clínicos como letargo, fiebre, palidez y linfadenopatía (Sykes & Foley, 2013).

Después de 1 o 2 semanas que el perro ha contraído la enfermedad, la gravedad de la trombocitopenia puede incrementarse y el porcentaje de plaquetas infectadas es más alto durante la parasitemia inicial o fase aguda de la enfermedad, donde el recuento plaquetario puede llegar a ser menor a 20.000 plaquetas/ μ L, sin embargo, posterior a la 3 o 4 semana de la infección, las mórulas en las plaquetas se vuelven casi invisibles al microscopio y el número de plaquetas vuelve a estabilizarse, a partir de ese momento, los ciclos de trombocitopenia y bacteriemia ocurren a intervalos de 7 a 14 días por lo que la enfermedad persiste en los perros de manera crónica (Cardoso et al., 2020; De Tommasi et al., 2014).

La fase aguda de TCC como se describió anteriormente, inicia después de un periodo de incubación de 1 a 2 semanas y ocasiona la trombocitopenia transitoria acompañada de fiebre, aunque algunos perros pueden no presentar signos. Cardoso et al., (2020) indican que una infección por *A. platys* produce el agrandamiento de los ganglios linfáticos en los canes enfermos, y en algunos casos signos clínicos más severos como dolor abdominal, esplenomegalia, fiebre alta, monocitosis, hematocrito bajo, anorexia, depresión, pérdida de peso, epistaxis transitoria, mucosas pálidas, trombocitopenia grave, anemia, leucopenia e hiperproteinemia. En cambio, durante la fase crónica solo se mantendrá un recuento bajo de plaquetas general (trombocitopenia

moderada), parasitemia baja y una adaptación del organismo infectado a la enfermedad (Cardoso et al., 2020).

2.8. Respuesta inmunitaria

La respuesta inmune del huésped frente a la infección por *A. platys* no se encuentra descrita a mayor detalle, sin embargo, se sabe que uno de los principales mecanismos de resistencia contra el género *Anaplasma* es la activación de los linfocitos T_H1 en presencia de las citocinas IFN- γ y TNF- α que se encargan especialmente de eliminar los patógenos intracelulares como lo es *A. platys*, no obstante, el exceso de citosinas proinflamatorias puede llevar a un agravamiento del cuadro clínico del huésped (Cardoso et al., 2020).

Las respuestas inmunitarias permanecen activas mientras las plaquetas son secuestradas en el bazo para su destrucción, pero cabe recalcar que los mecanismos de defensa contra cualquier especie del género *Anaplasmataceae* conducen al daño tisular en el hígado del hospedador, debido a la inducción proinflamatoria que conduce la bacteria, independientemente si su carga es baja o alta (Cardoso et al., 2020; De Tommasi et al., 2014).

2.9. Diagnóstico

La identificación de *A. platys* puede realizarse posterior al contacto de un canino con las garrapatas, si bien la infección puede iniciar leve o asintomática, días posteriores llegará a convertirse en una trombocitopenia grave con posibilidad de causar hemorragias, por tanto, es recomendable hacer un examen de conteo sanguíneo completo (CBC) que mostrará un recuento bajo de plaquetas cuando el perro sea un posible positivo, con ese antecedente se podrá realizar una diagnóstico directo, serológico o molecular más completo (Lara et al., 2020; McFee, 2018).

2.9.1. Diagnóstico directo

Durante la bacteriemia inicial o fase aguda de la enfermedad, se podrá utilizar la microscopía óptica convencional para identificar en un frotis sanguíneo teñido con Giemsa o Wright las inclusiones que forman *A. platys* dentro de las plaquetas del canino infectado, no obstante, esta evaluación no es totalmente confiable ya que se puede confundir el diagnóstico con otro tipo de afección, y la principal desventaja es que si el can se encuentra en una fase crónica de trombocitopenia, la revisión microscópica no podrá definir la aparición de inclusiones (Atif et al., 2021).

2.9.2. Serología

Se emplea serología para medir cuantitativa o cualitativamente la reacción antígeno-anticuerpo de una infección producida por *A. platys*, sin embargo, el mayor problema con este tipo de ensayos es que carecen de sensibilidad en las etapas tempranas de la enfermedad, ya que los anticuerpos solo son detectables después de 1 a 2 semanas del inicio de la patogenia, además, en algunos casos puede existir la detección cruzada entre especies de *Anaplasma* ya que son similares (Cardoso et al., 2020).

2.9.2.1. Inmunofluorescencia (IFA)

La Inmunofluorescencia se emplea como prueba serológica para detectar anticuerpos contra *A. platys* mediante la reacción antígeno-anticuerpo, aunque esta técnica puede tener suficiente sensibilidad carece de especificidad, debido a que también identifica anticuerpos de otras especies de *Anaplasma* como *A. phagocytophilum*, por tanto, en regiones donde además de *A. platys* existe la prevalencia de otras anaplasma no se podrá distinguir entre especies mediante este diagnóstico (Lara et al., 2020) .

2.9.2.2. Elisa Snap 4Dx

El test ELISA Snap 4Dx es un kit comercial empleado comúnmente por tener una sensibilidad de 99,1% y especificidad de 100%, da como resultado la detección de anticuerpos contra *A. platys* y otras especies como *A. phagocytophilum*, *E. ewingii*, *E. canis*, *B. burgdorferi* el ELISA Snap emplea antígenos purificados que proporcionan mayor sensibilidad y especificidad, lo que permite evaluar la presencia de anticuerpos muy específicos frente a los patógenos mencionados anteriormente, descartando falsos positivos, es por ello que este kit se considera de alta utilidad clínica y diagnóstico rápido, además, puede realizar periódicamente (Troncoso et al., 2014).

2.9.2.3. Inmunocromatografía

La Inmunocromatografía se considera como una prueba de punto de atención (POC) que mediante un ensayo de flujo lateral cualitativo permite detectar anticuerpos de *A. phagocytophilum* y *A. platys*, este test comercial puede determinar la presencia de IgM e IgG solo posterior a los 10-15 días de la infección y no es recomendable para establecer un diagnóstico final, entre las marcas más utilizadas se encuentra el Rapid *Anaplasma* Ab Test Kit de la empresa BIONOTE, MegaCorDiagnostik y FASTest *Anaplasma* (Lara et al., 2020).

2.9.3. Diagnóstico molecular

2.9.3.1 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

El diagnóstico molecular de PCR es altamente específico y sensible para la detección de *A. platys* tanto en fase aguda como crónica de la enfermedad, hasta el momento, la PCR es el único ensayo capaz de identificar particularmente ADN de *A. platys* de manera específica (Sykes & Foley, 2013). Según varios estudios, esta prueba

permite obtener un diagnóstico confiable y puede ser usada de tipo multiplex, en tiempo real o anidada.

Según Silaghi et al., 2017 la detección molecular basada en las secuencias del *16S rRNA* aumentan la especificidad del diagnóstico.

2.9.3.2 LAMP (Amplificación isotérmica mediada por loops)

La técnica de LAMP es otro método molecular de diagnóstico que se caracteriza por tener varias ventajas como alta sensibilidad y especificidad, es simple, rápida en comparación a una PCR, robusta y más económica, incluso, no necesita un equipo especializado para llevarse a cabo ya que trabaja a una misma temperatura durante todo el proceso (Atif et al., 2021).

En un estudio Li et al., (2014) diseñaron una LAMP para identificar *A. platys* usando secuencias del gen citrato sintasa 63 °C durante 30 min y obtuvieron resultados uniformes e iguales que con una PCR anidada.

2.9.3.3 RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica)

Esta técnica emplea enzimas de restricción (RE) para evaluar la variabilidad del tamaño de fragmentos de restricción específicos obtenidos mediante el corte las endonucleasas en diferentes muestras de ADN, a lo que se le conoce como RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica) y pueden ser visualizados mediante electroforesis (Di Felice et al., 2019).

Guillemi et al., 2015 mencionan estudios donde se han desarrollado sistemas de identificación y discriminación de especies usando RE en productos de PCR, con los cuales se ha podido diferenciar especies y hasta genotipos del orden *Rickettsiales*.

2.10. Tratamiento y control

El fármaco recomendado para perros con infección por *A. platys* es la doxiciclina, aunque se desconoce la dosis correcta, se aplica 10 mg/kg q24h durante 8 días, bajo esta prescripción parece haber una correcta eliminación de la bacteria en los canes, en el caso que *A. platys* infecte humanos, el tratamiento también se realiza con el mismo antibiótico, según McFee (2018) las dosis a emplear son las que se indican en la tabla 1.

Tabla 1

Dosis recomendada para el tratamiento de infecciones por A. platys.

Paciente	Concentración	Prescripción	Días
Caninos	10 mg/kg	q24h	8-14
Personas adultas	100 mg	q12 h	7-10
Niños menores a 45 kg	2,2 mg/kg	q12 h	7-10

Nota. McFee (2018, p. 297).

La manera más efectiva de controlar y evitar infecciones por *A. platys* es enfocándose en el control de los vectores que actúan como reservorios de la bacteria, aplicando las medidas sanitarias e higiénicas correctas en cuanto a la tenencia de mascotas como perros o gatos, de manera que se evite la transmisión de la enfermedad y propagación del vector (Sykes & Foley, 2013).

Capítulo III: Materiales y Métodos

3.1. Toma de muestras

Se recolectó un total de 102 muestras sanguíneas, la primera toma se realizó a los canes albergados en el refugio Narices Frías, el cual está distribuido en dos localidades distintas de la ciudad, por tanto, se empezó por el sitio donde habitan menos perros, obteniendo de allí un total de 20 muestras, mientras que en el segundo lugar se tomó un conjunto de 34. Adicionalmente, se procedió hacer un muestreo externo en la ciudad de Chone, del cual se obtuvo 22 muestras procedentes de un refugio local de voluntariado. Además, nos fueron proporcionadas 26 muestras más provenientes de una clínica veterinaria de Bahía de Caráquez.

Posterior a ello, se transportó y almacenó las muestras en el laboratorio de biología molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, para realizar las respectivas extracciones de ADN el día siguiente.

3.2. Extracción de sangre total

Se utilizó la técnica de venopunción con jeringuillas de 4mL y vacutainer para obtener sangre total de los caninos a partir de la vena cefálica ubicada en sus extremidades superiores, cada muestra fue recolectada y homogenizada en tubos rotulados de tapa lila en presencia de EDTA para evitar su coagulación, y posteriormente ser llevados a refrigeración (4°C) dentro del laboratorio.

3.3. Frotis sanguíneos

Los frotis sanguíneos se realizaron con las muestras frescas sin previa refrigeración, utilizando portaobjetos esmerilados de 25,4 x 76,2 mm. Se tomó un primer

portaobjeto rotulado y ubicado verticalmente sobre la mesa de trabajo, en el cual se colocó 3 μ L de sangre al lado cercano de la etiqueta, a continuación, se tomó un segundo portaobjeto en posición horizontal y se lo situó en un ángulo de 30-45 ° sobre la gota de sangre para proceder a moverlo ligeramente de izquierda a derecha, por último, se extendió homogéneamente la sangre hasta el extremo final del primer portaobjeto y se dejó secar el extendido por 2-3 minutos.

3.4. Tinción Giemsa

Se realizó la tinción Giemsa en todos los frotis sanguíneos, para ello, se procedió a preparar una solución (1:9) de reactivo Giemsa BIOGENA más agua destilada, se ordenó todos los extendidos sobre las cubetas de tinción y se fijaron añadiendo metanol absoluto durante 5 minutos, sin necesidad de lavar o secar, se colocó inmediatamente la solución Giemsa sobre todos los extendidos, y asegurándose que tuvieran suficiente reactivo se dejó en reposo durante 25 minutos, transcurrido el tiempo, se lavó cuidadosamente cada muestra con agua potable, evitando que se dañara el extendido. Finalmente, se retiró el exceso de agua con papel absorbente y se dejó secar por 24h.

3.5. Identificación microscópica

Se observó en el microscopio óptico con el lente de 100 X y aceite de inmersión las diferentes células sanguíneas hasta identificar inclusiones en las posibles plaquetas infectadas por *A. platys*.

3.6. Extracción de ADN total

Se utilizó el protocolo para extracción de ADN citado en la Tabla 2, que fue estandarizado dentro del laboratorio de biología molecular a partir de metodologías según Riera et al., (2010) y Sambrook & Rusell, (2001).

Tabla 2*Protocolo para la extracción de ADN en sangre.*

N°	Procedimiento	Cantidad (µL)
1	Transferir µL sangre total del tubo recolector con EDTA a un eppendorf de 1,5 µL	500
2	Añadir Buffer GR (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], Tritón X-100 1%, sacarosa 600 Mm) y homogenizar en el vórtex durante 30 s	540
3	Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante	
4	Repetir los pasos 2 y 3, hasta descartar un sobrenadante claro	
5	En el pellet obtenido, colocar buffer GB (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], NaCl 400 mM, EDTA 2 mM)	180
6	Añadir proteinasa K preparada en buffer PK (20mg/mL)	20
7	Añadir SDS al 20% y homogenizar la solución en vórtex por 30 s	6
8	Llevar a baño maría con temperatura de 56°C durante 2 horas	
9	Transcurrido el tiempo, dejar enfriar a temperatura ambiente	
10	Añadir acetato de potasio 3M y homogenizar invirtiendo el eppendorf	90
11	Centrifugar por 7 minutos a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante	
12	Repetir los pasos 10 y 11 hasta que el sobrenadante se encuentre lo más limpio posible	
13	Colocar en el sobrenadante obtenido etanol absoluto a (-20 °C)	600
14	Dejar la muestra 30 minutos a (-20°C) o también overnigth	
15	Centrifugar por 7 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante	
16	Añadir etanol al 70% para lavar el pellet obtenido	100
17	Centrifugar nuevamente por 7 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante	
18	Dejar secar el pellet obtenido a 37°C	

N°	Procedimiento	Cantidad (μL)
19	Resuspender el pellet con Buffer TE y dejar homogenizar a temperatura ambiente durante 20 minutos	50
20	Almacenar a (-20°C)	

Nota. Modificado de Riera, Rojas, & Zapata (2010, p. 5). Sambrook & Rusell, (2001, p. 821)

3.7. Verificación del ADN extraído

Se evidenció el ADN extraído mediante electroforesis, se preparó geles de agarosa al 0,8% (p/v) con buffer TAE 1x y bromuro de etidio 1/10.000, cada pocillo del gel se cargó con 3 μL de muestra y la misma cantidad de buffer de carga Blue Juice 2X. Los geles se corrieron durante 45 minutos con un voltaje de 100 V.

3.8. Controles positivos de *Anaplasma marginale*

Se utilizó dos controles positivos de *Anaplasma marginale* obtenidos del banco reservorio de ADN del laboratorio de biología molecular, los cuales provenían de un muestreo realizado en Calceta-Chone, donde se considera que *A. marginale* es endémica de la zona. Estos controles fueron empleados para la estandarización de la PCR con cebadores genéricos capaces de reconocer dos especies del orden *Rickettsias*, *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis*. También se utilizó un producto PCR de una de estas muestras como control positivo en el corte con enzimas de restricción.

3.9. PCR convencional para la detección de *Rickettsias*.

Se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar los cebadores adecuados que permitieran la detección de *A. platys* en ADN genómico de muestras sanguíneas caninas, por tanto, se tomó como referencia el trabajo de (Alhassan et al., 2021; Parola

et al., 2000; Inokuma et al., 2001) de donde se obtuvieron los cebadores generales dirigidos al gen 16S rRNA para detectar la presencia de *Rickettsias* como las especies *E. canis* y *A. platys*. Del mismo trabajo se obtuvo los cebadores específicos para *A. platys* tal cual se observa en la Tabla 3.

Tabla 3

Cebadores para la amplificación de Anaplasma.

Nombre de los Cebadores	Dirección	Secuencias	(pb)
EHR16SF	Forward	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345
EHR16SR	Reverse	TAGCACTCATCGTTTACAGC	
Aplatys.16S-F	Forward	TTTGTCGTAGCTTGCTAT	349
Aplatys.16S-R	Reverse	CTTTGTGGGTACCGTC	

Nota. Inokuma et al., (2001, p.241). Alhassan et al., (2021, p. 4). Parola et al., (2000, p.707).

Las concentraciones de los reactivos se determinaron en la tabla 4 , mientras que las condiciones de amplificación fueron tomadas y modificadas del trabajo de Alhassan et al., (2021) y se encuentran detalladas en la tabla 5.

Tabla 4

Concentración de reactivos para la PCR de Anaplasma.

Reactivos	Concentración final	Volumen (µL)
<i>H₂O</i>	-	-
Buffer+MgCl₂	1.00 mM	2.50
Cebador Forward	0.50 µM	1.25
Cebador Reverse	0.50 µM	1.25
dNTP	0.2 mM	2.00
Taq	0.625 U/µL	0.10

Reactivos	Concentración final	Volumen (µL)
ADN	100 ng/µL	1
Volumen final		25.00

Nota. Modificado de Alhassan et al., (2021, p. 4).

Tabla 5

Condiciones para la amplificación de PCR para Anaplasma

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Hibridación	55	30s	40
Extensión	72	1 min	40
Extensión final	72	10 min	1
Mantenimiento	10	-	-

Nota. Modificado de Alhassan et al., (2021, p. 4).

Para la PCR con cebadores genéricos se utilizó un control negativo que no incluía la adición de ADN y el control positivo con ADN de *A. marginale*.

3.10. Diferenciación de especies del orden *Rickettias* mediante RFLP.

Después de verificar en electroforesis los casos positivos obtenidos de la PCR con cebadores genéricos EHR16SF y EHR16SR, se procedió a utilizar la herramienta bioinformática RestrictionMapper para buscar de acuerdo al inventario de enzimas disponibles en el laboratorio, una endonucleasa de restricción que permitiera diferenciar entre las especies *E. canis* y *A. platys* de las muestras positivas.

Se seleccionó la enzima HindIII de Promega, la cual reconoce el sitio 5'-A/AGCTT-3' y se preparó una master mix de la enzima modificando el protocolo planteado por el fabricante, en la Tabla 6 se detallan los reactivos y cantidades. Finalmente, se agregó 5 μ L de mezcla a los 15 μ L de productos PCR, la reacción se llevó a cabo durante 4h a 37°C. Los resultados se verificaron con electroforesis en gel de agarosa al 4%.

Tabla 6

Condiciones para master mix de HindIII

Reactivos	Unidad	Stock	Volumen (μL)
H2O	μ L	N/A	1,80
Buffer E	X	10,00	2,00
HindIII	U/ μ L	10,00	1,00
BSA	ug/ μ L	10,00	0,20
Producto PCR	ug/ μ L		15,00
Total			20,00

Nota. Modificado de Assembly of Restriction Enzyme Digestions de Promega Corporation (2011, p. 3).

3.11. Análisis estadístico

3.11.1. Diseño no experimental

Se llevó a cabo este tipo de diseño para evaluar la información sobre la prevalencia de *A. platys* en todos los refugios muestreados, tomando en cuenta la observación del desarrollo del estudio y recolección de datos, con el fin de establecer las variables y reportes al momento de concluir con la investigación.

3.11.2. Variable de respuesta

Se determinó como variable de respuesta o dependiente a los resultados obtenidos posteriores al muestreo, para identificar el cambio y la correlación que podía tener con otros factores mientras se realizó el estudio.

3.11.3. Análisis

El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda de Excel .

3.11.4. Estadística descriptiva

Se realizó con los registros obtenidos de todos los muestreos, los frotis sanguíneos, y las pruebas moleculares de PCR y RFLP, con ello se ordenó y caracterizó cada grupo de datos.

3.11.5. Datos de prevalencia

Se determinó la prevalencia ya que no existen registros anteriores de la presencia de *A. platys* en los refugios muestreados de las distintas ciudades, y gracias a esta medida es posible conocer los casos de una enfermedad en una población y tiempo determinado. Para ello, se procedió a calcular la relación entre el número de casos positivos identificados mediante RFLP y la población canina total muestreada por cada refugio.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

4.1. Distribución por sexo de los muestreos

La mayor parte de canes muestreados en el albergue Narices Frías de la ciudad de Santo Domingo fueron hembras, tal como se observa en la Figura 4. Por otra parte, en el refugio de Chone se muestreó igual número de hembras y machos, Figura 5. De las muestras que fueron proporcionadas por la clínica de Bahía no fue necesario realizar esta distribución, puesto que los datos ya se encontraban procesados dentro de la veterinaria.

Figura 4

Sexo de los canes muestreados en el refugio Narices Frías

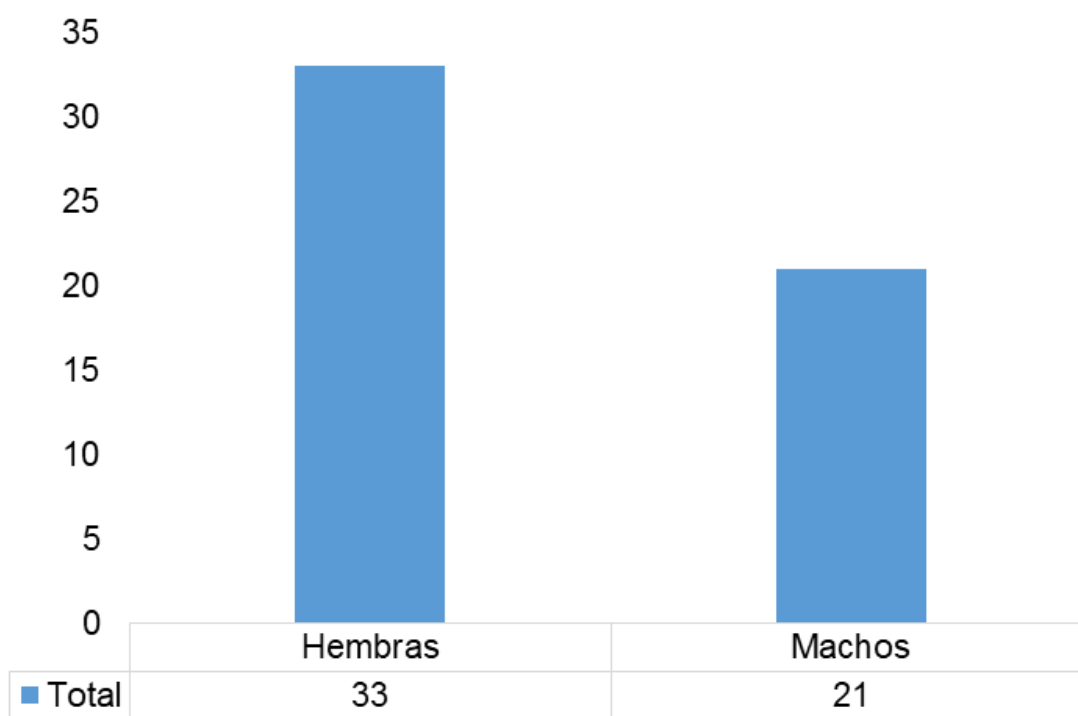
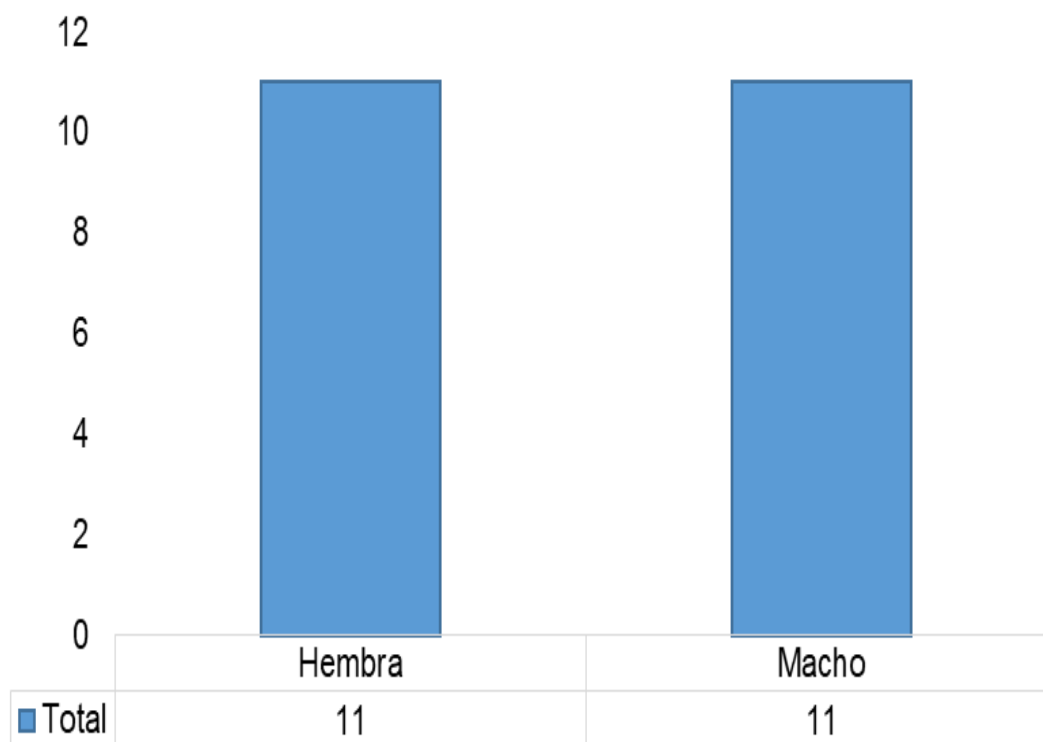


Figura 5

Sexo de los canes muestreados en el refugio de Chone

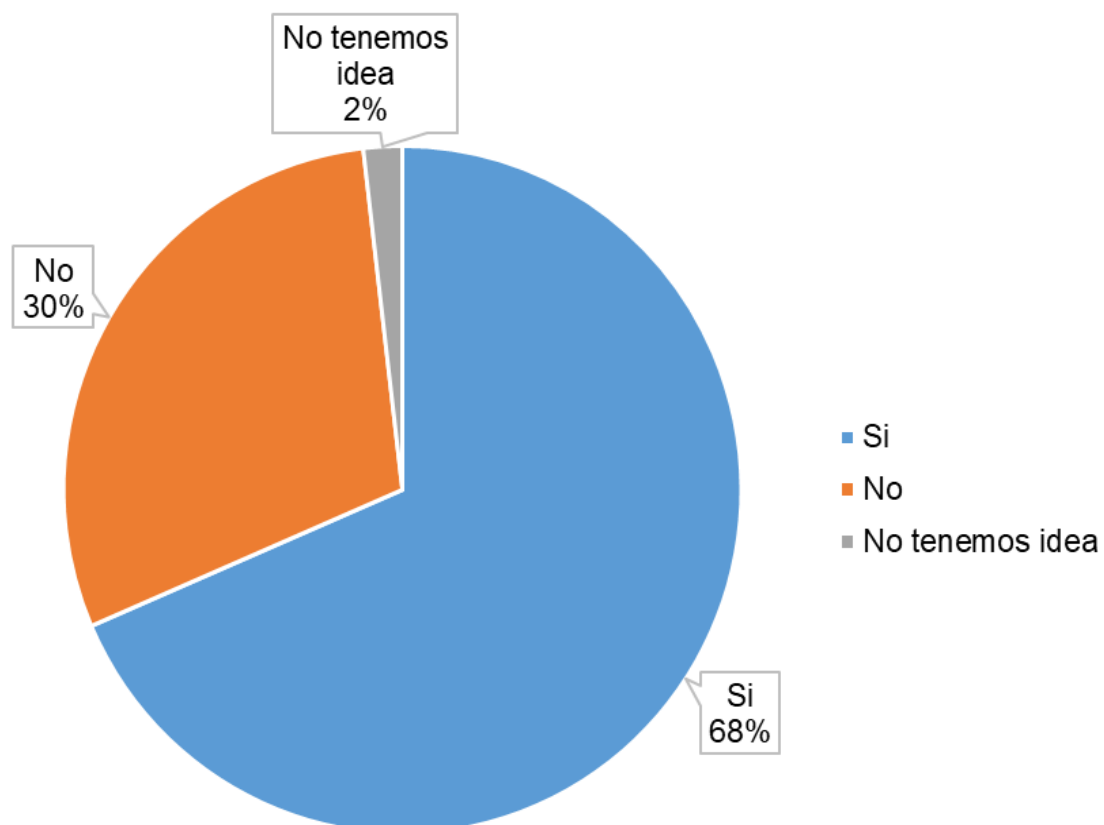


4.2. Presencia de vectores

En las dos localidades del refugio Narices frías se validó el contacto de varios caninos con las garrapatas, como se muestra en la Figura 6, alrededor del 68% o sea 37 perros de un total de 54, han estado o se encuentran parasitados con el vector. A pesar que durante el muestreo se tomaron otros datos como, edad y sexo, no se realizó ninguna correlación de estas variables con la aparición ni prevalencia de la enfermedad, pues según Sainz et al., (2015) estos factores no son determinantes para el diagnóstico de la anaplasmosis canina.

Figura 6

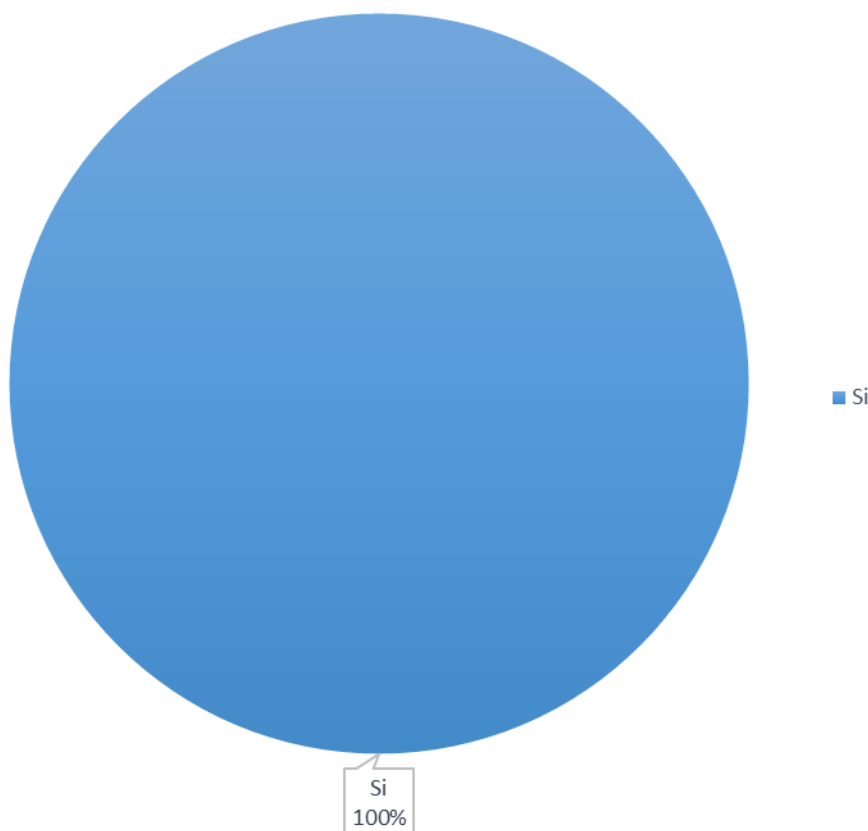
Canes en contacto con garrapatas en las dos localidades del refugio Narices Frías



En cuanto al muestro realizado en Chone, se obtuvo un porcentaje de contacto a garrapatas del 100%, es decir, los 22 perros albergados en el lugar se encontraban parasitados con el vector, tal como como se detalla en la Figura 7. De igual manera, para este análisis las muestras obtenidas de la clínica de Bahía no se tomaron en cuenta debido a la falta de información en cuanto a si las mascotas estuvieron en contacto o no con garrapatas.

Figura 7

Canes en contacto con garrapatas en el refugio de Chone



Durante el estudio fue importante conocer la prevalencia de los vectores dentro de los refugios, para saber qué tan expuestos podrían estar los caninos a contraer CVBD (enfermedades transmitidas por vectores de compañía). El resultado apuntó al hecho de que en los albergues existe una alta exposición a los vectores, debido a que los perros que ingresan a estos lugares de acopio se encuentran mayoritariamente en condiciones de abandono o provienen de hogares donde no hay un debido interés en el cuidado del animal. Maggi & Krämer (2019) mencionan que en casi todos los países de latinoamérica, la prevalencia de vectores que transmiten enfermedades a los animales domésticos es alta, debido a la falta de sensibilidad, bajos recursos económicos e irresponsabilidad en

la tenencia de mascotas, además, al ser una región biodiversa con climas que varían de tropicales a subtropicales, se ve favorecida la reproducción y distribución del ectoparásito.

Dentro de la provincia Tsáchila no existen publicaciones de la prevalencia de *A. platys* ni de su principal vector *Rhipicephalus sanguineus*, sin embargo, el directorio de la Fundación Charles Darwin localizada en la Isla Santa Cruz, Galápagos-Ecuador, tiene un registro de la existencia de *R. sanguineus* dentro del territorio, y se menciona que esta especie fue introducida por turistas y mascotas provenientes de la región litoral del país, además, en la investigación de Jimenez et al., (2020) se registran infecciones por *Anaplasma* dentro de la Isla Santa Cruz e Isabela en caninos que estuvieron en contacto con garrapatas, concorde a ello, se estima que el riesgo a que los perros contraigan anaplasmosis está directamente relacionada a la exposición con sus vectores.

4.3. Frotis sanguíneos

La tinción de frotis permitió observar la morfología de las células sanguíneas en las 102 muestras. Mediante el diagnóstico óptico se logró identificar en dos muestras la aparición de manchas violetas en forma de mórulas dentro de las plaquetas y aumento de las mismas en diferentes campos. Tabla 7.

Tabla 7

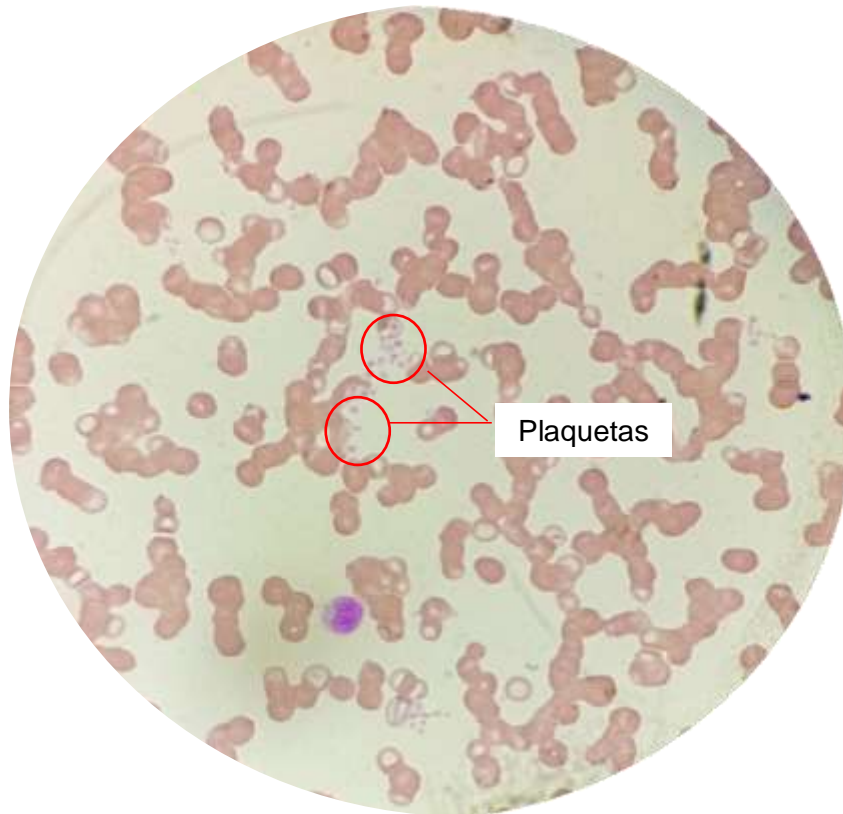
Muestras evaluadas en frotis sanguíneos.

Refugios	Animales muestreados	Frotis	
		(+)	%
Localidad 1	20	0	0
Localidad 2	34	0	0
Chone	22	2	9
Bahía	26	0	0
Total	54	0	0
Prevalencia		2	9

La tinción Giemsa permitió diferenciar las células sanguíneas en el extendido, por lo que en las muestras 67 y 75 se observó posibles inclusiones de color violeta oscuro en las plaquetas, siendo estas particulares de la bacteria. Como mencionan Atif et al., (2021), *A. platys* es un microorganismo que tiene total afinidad por infectar las plaquetas y ocasionar la trombocitopenia cíclica, característica de la anaplasmosis canina.

Figura 8

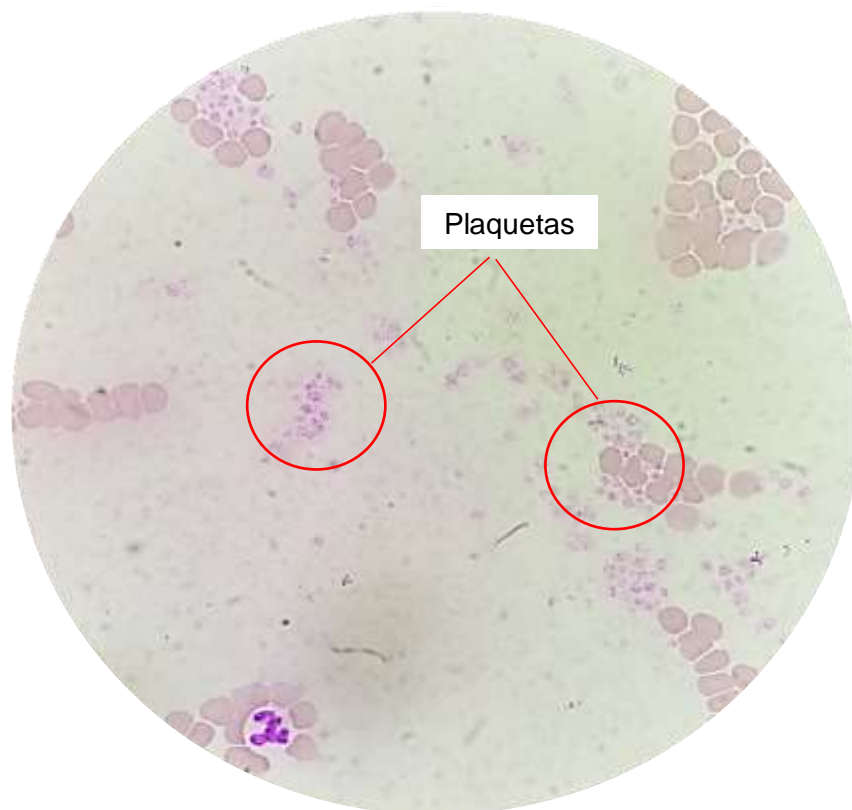
Frotis sanguíneo de la muestra 67



Nota. Plaquetas teñidas de color violeta con la tinción Giemsa, presentan inclusiones picnóticas dentro de sus estructuras observadas con el lente 100X.

Figura 9

Frotis sanguíneo de la muestra 75



Nota. Aumento de plaquetas por campo, presentan inclusiones picnóticas dentro de sus estructuras observadas con el lente 100X.

En las figuras 8 y 9 se puede observar como en las muestras 67 y 75 existe un aumento de plaquetas por campo e inclusiones dentro de las mismas. No obstante, el examen microscópico solo representa un 40% de confiabilidad, por lo que no se puede dar un diagnóstico final bajo estos resultados, ni tampoco descartar la presencia *A. platys* en algún otro canino, pues Sainz et al., (2015) indican que este método es sensible cuando la enfermedad se encuentra en una fase temprana, de estar en etapa crónica, podría omitirse la presencia de la bacteria en los frotis.

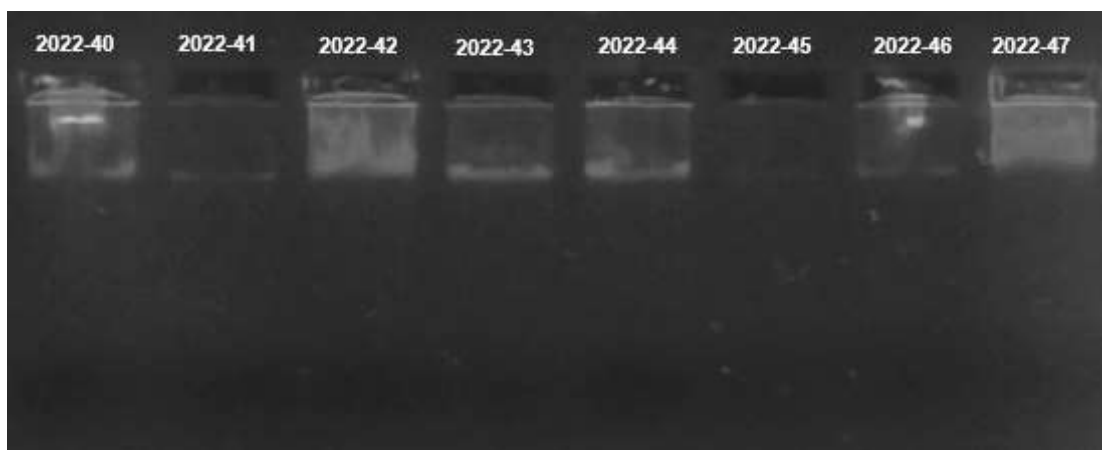
4.4. ADN extraído

El protocolo referido de Riera et al., (2010) y empleado para la extracción de ADN resultó ser apropiado para obtener el material genómico de las células sanguíneas de 101 muestras. Sin embargo, el ejemplar número 11 tomado en el primer muestreo no pudo ser procesado debido al volumen insuficiente de sangre. En la figura 9 se observa el ADN obtenido de 10 diferentes canes pertenecientes al refugio Narices Frías. Debido a que esta verificación es cualitativa, no se puede cuantificar el material genético exacto obtenido en cada muestra, no obstante, se deduce que la presencia de bandas más intensas que otras está relacionado con la cantidad de ADN extraído (Tu, 2005).

Las demás muestras también fueron visualizadas en geles de agarosa a condiciones similares que las detalladas en la Figura 10.

Figura 10

ADN extraído a partir de sangre total de canes.



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con buffer TAE 1x y Blue Juice 2x, cantidad de muestra cargada 3 μ L de ADN + 3 μ L de Blue Juice.

4.5. Estandarización de PCR para la identificación de *Rickettsias*

Durante la estandarización de la PCR para *Rickettsias* se probó dos protocolos diferentes, en los cuales se varió la concentración de los dNTPs y la Taq polimerasa, las condiciones finales que demostraron la amplificación correcta de los controles positivos se encuentran detalladas en la Tabla 4, además, también se modificó de Alhassan, et al., (2021) las condiciones de corrida para la PCR, aumentando el tiempo de desnaturalización inicial a cinco minutos y extensión final a diez, tal como se describe en la Tabla 5.

Figura 11

Estandarización de la condiciones para PCR



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1x y Blue Juice 2x, marcador de peso molecular 100bp Plus Opti-DNA Marker de Abm y controles positivos de *A. marginale*. Cantidad de muestra cargada 10 μ L de ADN+ 10 μ L de Blue Juice.

En la figura 11 se observa la presencia de dos bandas que corresponden a la amplificación de los controles positivos de *A. marginale*, se empleó estos controles ya que los cebadores utilizados fueron genéricos, es decir, capaces de reconocer cualquier

especie del género *Anaplasma* y otras especies del orden *Rickettsiales*, debido a que todos estos microorganismos comparten secuencias conservadas del gen (Inokuma et al., 2001). El estudio se llevó a cabo de esta manera para poder reconocer más de una especie que podrían estar afectando la salud de los canes, ya que *A. platys* no es la única capaz de infectar células sanguíneas de los perros, según Jimenez et al., 2020 en la parte Insular del Ecuador hay la prevalencia de otras bacterias del Orden *Rickettsiales* como *Ehrlichia canis*, que es transmitida por el mismo vector que *A. platys*, por ello, la realización de una primera PCR con cebadores genéricos permitió ampliar el diagnóstico y aumentar el reconocimiento de especies hemotrópicas en las muestras positivas.

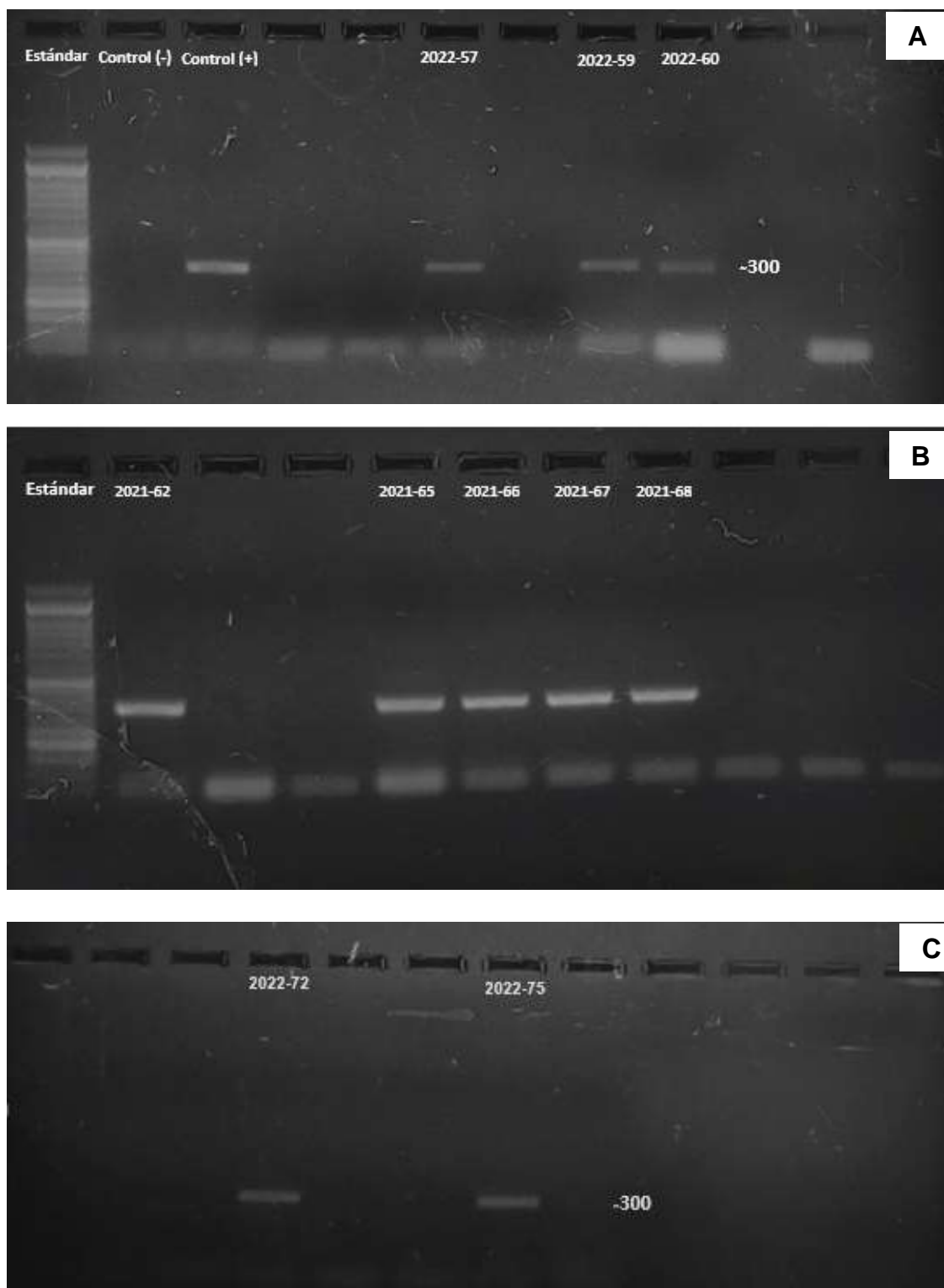
4.6. PCR convencional para *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis*

Con la PCR estandarizada para identificar *Rickettsias* se evaluó las 101 muestras de las cuales se obtuvo ADN, siendo que un total de 10 se amplificaron, los positivos corresponden a las muestras 57, 59, 60, 62, 65, 66, 67, 68, 72 y 75 tomadas en el refugio de Chone, no obstante, debido a que se utilizó cebadores genéricos no se podía determinar si las muestras positivas correspondían a especies de *Anaplasma* o *Ehrlichia*, ya que según Inokuma et al., 2001 estos son los dos únicos géneros pertenecientes al orden *Rickettsia* capaces de ser reconocidos por los cebadores genéricos EHR16SF y EHR16SR empleados en esta PCR.

En la figura 12 se puede observar las bandas correspondientes a las muestras positivas, que de acuerdo al estándar tienen un peso aproximado de 300bp, lo que se corroboró mediante bioinformática con el programa Sequence extractor (<https://www.bioinformatics.org/seqext/>), donde nos indicó que los fragmentos amplificados eran de 345 pb.

Figura 12

PCR para identificación del género Anaplasma



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1x y Blue Juice 2x, marcador de peso molecular 100bp Plus Opti-DNA Marker de Abm. Cantidad de muestra cargada 10 μ L de ADN+ 10 μ L de Blue Juice. (A) Muestras del 55 al 60. (B) Muestras del 59-69. (C) Muestras del 70-76.

Concorde a estos resultados, fue necesario emplear una metodología que permitiera discriminar entre ambas especies reconocidas por los cebadores genéricos, ya que el diagnóstico final implica identificar qué número de muestras son positivas para anaplasmosis canina.

4.7. Enzimas de restricción para identificar *Anaplasma platys*.

En vista que no fue posible obtener controles positivos para la estandarización de una nueva PCR con cebadores específicos para *A. platys*, se procedió a utilizar enzimas de restricción que pudieran cortar los productos de la PCR convencional y distinguir *Anaplasma* de los positivos.

Con las herramientas bioinformáticas Sequence extractor y RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>), se probó todas las enzimas disponibles en el inventario del laboratorio y se evaluó la opción que permitiera obtener fragmentos de diferentes longitudes para discriminar entre *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*. No obstante, debido a que ambas especies presentan secuencias conservadas, la mayor parte de enzimas realizó cortes en sitios homólogos con polimorfismos de igual o muy parecido tamaño, de manera que se optó por una enzima de restricción tipo II llamada HindIII capaz de reconocer y hacer cortes cohesivos solo en el ADN de *Ehrlichia canis*, como control positivo se utilizó los productos PCR de una muestra positiva para *A. marginale* que contenía ADN MSP5.

En la Figura 13 se observa como HindIII no fue capaz de reconocer los productos PCR cuando los amplicones presentan material genético de *Anaplasma platys*.

Figura 13

Digestión con HindIII en ADN de A. platys

Configuración	Incluir	Información de secuencia	Menú
Circular <input type="radio"/> Lineal <input checked="" type="radio"/>	Seleccionar enzimas individuales Hin4I Hin6I HinP1I Hinc II HindII HindIII HinfI	Sin letras no base. Números y espacios OK. Pegar secuencia aquí <pre>CGCAACAAGCCTTAATAACCCG CATTTCGGTACATCCGCAAG CCATTCAATTCCACTTTACGG TCCCGAATTGGGAC CTCGACGAAAATTATGACGGTC TGAGCTCAGGCCCTCTCCCTAT CGCCTTAAGTATTAAGCATCC ATCCTCCTTGTTGTCACCGCTT CCGCCGATAGACCAGGCCATGA CTGCGACTCCAGCCTTTCGCAC CCCTCGTTTGTCTT AATCTATGGGACCATCAGGTGC GACAT</pre>	Mapa de sitios Resumen virtual Reset Form
Ordenar por 1. <input type="text"/> 2. <input type="text"/> 3. <input type="text"/>	<input checked="" type="radio"/> todo comercial <input type="radio"/> NEB solamente <input checked="" type="checkbox"/> voladizo de 5' <input checked="" type="checkbox"/> voladizo de 3' <input checked="" type="checkbox"/> desafilado <input checked="" type="radio"/> Solo prototipos <input type="radio"/> Todos los isoesquizómeros	Nombra tu secuencia <input type="text" value="Untitled"/>	
Filtrado por Cortes Máximos <input type="text"/> Longitud mínima del sitio <input type="text" value="5"/>			

Sitios sin cortes

Las enzimas seleccionadas no digieren la secuencia.

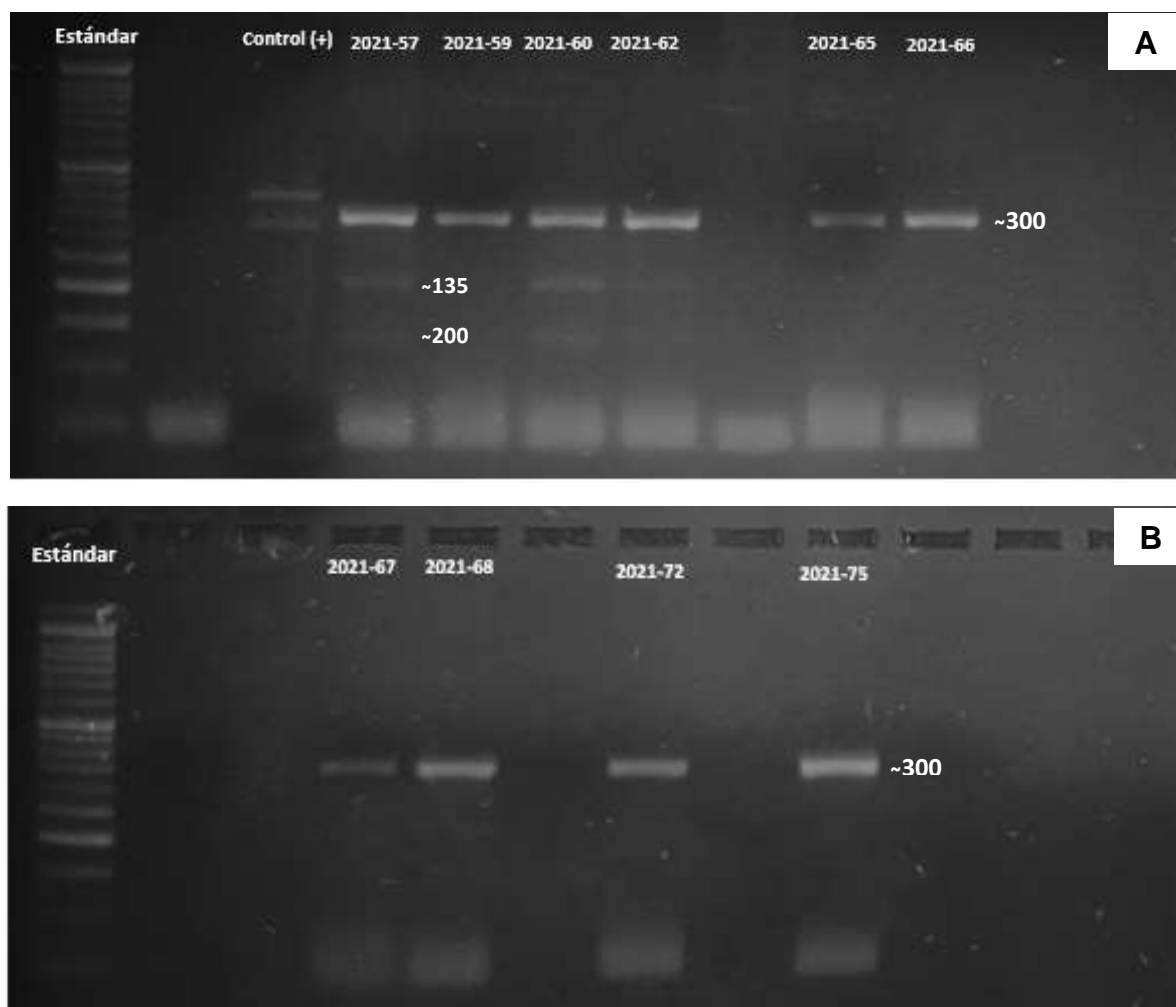
Debido a que HindIII solo reconoce el material genético de *Ehrlichia canis* se asume que en las muestras donde no se produjo los fragmentos de restricción de longitud polimórfica existe ADN de *A. platys*. Mediante electroforesis se observó que las muestras 59,65,66,67,68,72 y 75 no presentan ningún tipo de corte más que la banda del producto PCR, mientras que en las 3 restantes se distinguen los 2 fragmentos del corte realizado por la enzima. Figura 14.

El diagnóstico molecular basado en RFLP indica que hay siete canes contagiados con *A. platys* y tres con *E. canis* dentro del refugio de Chone, según Guillemi et al., 2015 esta herramienta es lo suficientemente confiable como para emitir un resultado final, por lo

que con los resultados obtenidos se pueden calcular la prevalencia de la enfermedad dentro del refugio.

Figura 14

RFLP obtenidos con el corte de HindIII



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 4% con buffer TAE 1x y marcador de peso molecular 100bp Plus Opti-DNA Marker de Abm. Cantidad de muestra cargada 20 μ L. (A) muestras del 57 al 66. (B) muestras del 67-75.

4.8. Prevalencia de *Anaplasma platys* en los refugios.

Dado que no se encontraron casos positivos en el refugio “Narices Frías” de la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas, ni en las muestras provenientes de la clínica veterinaria de Bahía, se determinó que la prevalencia de *A. platys* para estos dos lugares corresponde al 0%, mientras que para el refugio de Chone se calculó una prevalencia del 31,81%, como lo indica la Figura 15. Sin embargo, aunque no se evidenció la presencia de garrapatas dentro del refugio Narices Frías, se determina que los canes están expuestos a contraer enfermedades transmitidas por este vector.

Por otra parte, entre las muestras tomadas del refugio en Chone se obtuvo 10 animales positivos para *Rickettsias*, de los cuales siete se encuentran infectados por *Anaplasma platys* como se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8

Muestras positivas para A. platys.

N°	Nombre	Sexo	Edad	Garrapatas	Diagnóstico	
					Frotis	PCR-RFLP
59	Nena	Hembra	2 años	Sí		<i>Anaplasma platys</i>
65	Chiripa	Hembra	2 años	Sí		<i>Anaplasma platys</i>
66	Pipo	Macho	1 año	Sí		<i>Anaplasma platys</i>
67	Tequila	Macho	4 años	Sí	+	<i>Anaplasma platys</i>
68	Pirata	Macho	2 años	Sí		<i>Anaplasma platys</i>
72	Berlín	Macho	8 meses	Sí		<i>Anaplasma platys</i>
75	Lunita	Hembra	11 años	Sí	+	<i>Anaplasma platys</i>

Durante el estudio se empleó más de una herramienta para identificar la presencia de *A. platys* en los canes evaluados, en el caso de las muestras 67 y 75 se logró identificar microscópicamente al microorganismo y a la vez caracterizarlo con el diagnóstico molecular, sin embargo, en las demás muestras no se observó anomalías en las células sanguíneas a pesar de existir una infección, según Rucksaken et al., 2019 la falta de sensibilidad del examen microscópico se debe a que este tipo de pruebas requieren que el organismo presente una parasitemia alta para que la bacteria pueda ser identificada en el frotis sanguíneo.

El cálculo de la prevalencia en el refugio de Chone está representado de la siguiente manera:

P= Prevalencia

N+= Número de casos positivos

Nt= Número total de población muestreada

$$P = \frac{N_+}{N_t} = \frac{7}{22} \times 100 = 31,81\%$$

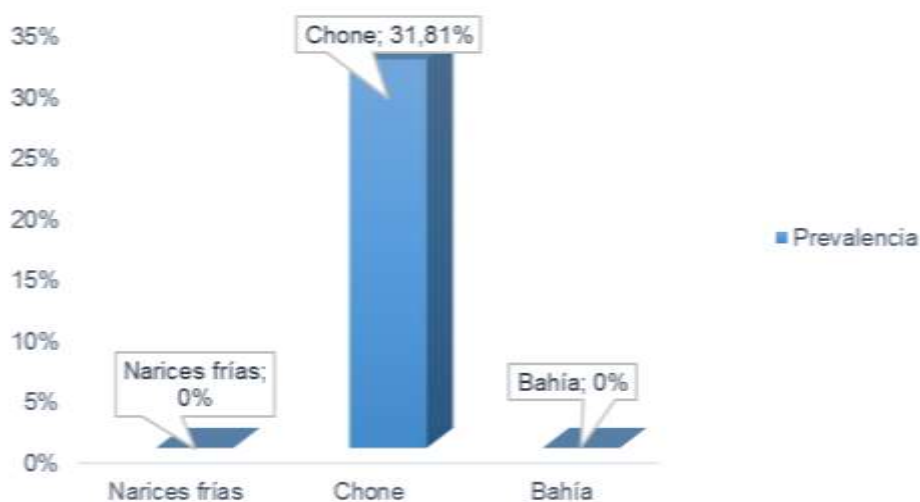
Teniendo en cuenta que se logró encontrar casos positivos en una de las tres ciudades de donde se tomaron muestras se puede determinar que la anaplasmosis canina es un hecho en el Ecuador y que por tanto, su principal vector la garrapata *R. sanguineus* también se encuentra distribuida fuera de la región Insular. En el trabajo de Rivadeneira-Barreiro et al., 2021 se menciona antecedentes de la existencia de *A. platys* en Colón, una zona de la provincia de Portoviejo al igual que Chone, tal parece, los factores climáticos y la falta de control de plagas en animales de compañía aumenta la prevalencia de esta enfermedad en la Provincia. Cabe recalcar que aunque la prevalencia que se calculó en este estudio es válida para el refugio, no se puede descartar otros casos

positivos fuera del albergue, ya que muchos de estos perros pasaron meses en abandono deambulando por las calles de la ciudad, lo que aumenta la distribución del vector y el riesgo de contagio para otros canes de la zona.

También cabe recalcar que a pesar de no encontrar caninos infectados en las otras muestras, se deja una puerta abierta a la existencia de *A. platys* u otras especies del género *Anaplasma* en las zonas residenciales y rurales de las ciudades de Bahía y Santo Domingo, ya que es frecuente encontrar caninos abandonados y parasitados con garrapatas, además, con los resultados de Chone y los estudios de Jimenez et al., 2020; Rivadeneira-Barreiro et al., 2021, queda claro que *R. sanguineus* el principal vector reservorio del patógeno está presente en el país, y que al tener afinidad por climas cálidos como el de Santo Domingo o Bahía, las provincias serían un hábitad óptimo para su desarrollo y reproducción.

Figura 15

Prevalencia de *A. platys* dentro del estudio.



Dado los resultados, es importante señalar que hace falta un mejor manejo de la sanidad animal, que permita disminuir la propagación del vector, como también la implementación de diagnósticos sensibles y específicos en todo el país y Lationamérica, donde la anaplasmosis canina aún no está identificada, a pesar de ser reconocida como una enfermedad de carácter zoonótico (Maggi & Krämer, 2019).

Capítulo V: Conclusiones

El actual estudio evaluó la presencia de *A. platys* detectable por microscopía óptica y análisis molecular con PCR en 102 muestras de sangre canina obtenidas del albergue Narices Frías, ubicado en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas, un albergue de voluntariado en Chone y una clínica veterinaria de la ciudad de Bahía. Utilizando las dos técnicas de diagnóstico se encontró 7 casos positivos pertenecientes a las muestras tomadas del refugio de Chone, donde se determinó una prevalencia del 31,81%, en los otros lugares, la prevalencia fue del 0% al no encontrarse ningún caso positivo. La estadística descriptiva de los datos tomados ha proporcionado información relevante sobre la exposición que tienen las mascotas a los principales vectores transmisores de la anaplasmosis canina, que además, se considera de carácter zoonótico. En el refugio Narices frías, alrededor del 63%, es decir, más de la mitad de los canes muestreados, se encontraban parasitados con garrapatas, mientras que en el refugio de Chone, todos los canes mantenían un contacto directo con los vectores sin recibir tratamiento alguno para el debido control del ectoparásito.

El supuesto por el cual se llevó a cabo esta investigación fue reportar la existencia de anaplasmosis canina en la provincia u otros lugares de donde se obtuvo muestras, bajo antecedentes de signos clínicos y presencia del vector en las zonas, ya que durante los últimos años se ha reportado *A. platys* en varios países de Latinoamérica incluyendo a Ecuador en los trabajos de Rivadeneira-Barreiro et al., 2021 y Jimenez et al., 2020. Otros datos de vital importancia, que afirman el hecho de que no hay una correcta vigilancia en el control de vectores, es el alto porcentaje del contacto garrapata-perro que se determinó en los dos refugios, lo que aumenta el riesgo de enfermedades en los canes y humanos. Por otra parte, las prevalencias del 0% de *A. platys*, no aseguran que la zona

de donde provinieron las muestras estén libres de perros infectados por esta u otra bacteria del Orden *Rickettsiales*, puesto que existen antecedentes en el trabajo de Jimenez et al., (2020) de la prevalencia del vector *Rhiphicepalus sanguineus* en el Ecuador.

Dado que no se contó con el tiempo suficiente para realizar la secuenciación de muestras positivas, no hay detalle sobre la clasificación filogenética de ninguna bacteria del género *Anaplasma* identificada en el refugio de Chone.

Capítulo VI: Recomendaciones

En vista que no se encontraron muestras positivas para *A. platys* dentro de las localidades del albergue Refugio Narices Frías, se recomienda ampliar el estudio y llevar a cabo un muestreo en zonas residenciales y rurales de la ciudad.

Se recomienda continuar con muestreos externos al refugio de Chone, con el propósito de ampliar el estudio e informar a la ciudadanía sobre la prevalencia de *A. platys* en la población canina de la ciudad.

Debido a que existe un gran contacto garrapata-perro en los establecimientos de acopio, es recomendable tomar medidas sanitarias de control que permitan disminuir la transmisión de enfermedades entre caninos y a su vez prevenir la zoonosis dentro y fuera del refugio, teniendo en cuenta que existen datos de prevalencia en el país, dejando la posibilidad de la existencia del patógeno en otras provincias de la Costa, Sierra y Amazonía.

En caso de estudios futuros donde se aborde el mismo tema, se recomienda utilizar técnicas de diagnóstico moleculares como la PCR, debido a su alta sensibilidad y especificidad para detectar material genético de interés, además, también se sugiere el uso de más de un juego de cebadores en los que se incluyan genéricos, de esa manera se podrá obtener más antecedentes del género *Anaplasma* en el país.

Capítulo VII: Bibliografía

- 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 and Tick-borne Diseases*, 12(4).
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101727>
- Arraga-Alvarado, C. M., Qurollo, B. A., Parra, O. C., Berrueta, M. A., Hegarty, B. C., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Case report: Molecular evidence of anaplasma platys infection in two women from venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), 1161-1165. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>
- Atif, F. A., Mehnaz, S., Qamar, M. F., Roheen, T., Sajid, M. S., Ehtisham-ul-haque, S., Kashif, M., & Said, M. B. (2021). Epidemiology , Diagnosis , and Control of Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia and Granulocytic Anaplasmosis : Emerging Diseases of Veterinary and Public Health Significance. *Veterinary Sciences*, 8(12), 312. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/vetsci8120312>
- Bakken, J. S., & Dumler, J. S. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinical Infectious Disease*, 30(1), 1173-1176. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511722240.170>
- Cardoso, S., Paludo, G., Da Silva, J., Honório-França, A., & Luzia França, E. (2020). Hemorheological Evaluation and Cytokine Production in Dogs Naturally Infected with Anaplasmatataceae. In G. A. Bastidas, & A. A. Kamboh, *Parasitology and Microbiology Research* (pp. 601-861). IntechOpen.
- CDC. (6 de Agosto de 2021). *Centers for disease control and prevetion*. Centers for disease control and prevetion:
<https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html>
- De Tommasi, A. S., Baneth, G., Breitschwerdt, E. B., Stanneck, D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., & De Caprariis, D. (2014). *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2231-2234. <https://doi.org/10.1128/JCM.00395-14>
- Di Felice, F., Micheli, G., & Camilloni, G. (2019). Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *Journal of Biosciences*, 44(2).
<https://doi.org/10.1007/s12038-019-9856-8>
- 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 Anaplasmatataceae 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2145-2165.
<https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Eiras, D. F., Eiras, D. F., Vezzani, D., Eyal, O., & Baneth, G. (2013). First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina.

- Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(2), 169-173.
<https://doi.org/doi:10.1016/j.cimid.2012.11.008>
- El Hamiani Khatat, S., Kachani, M., Duchateau, L., Elhachimi, L., Sahibi, H., & Daminet, S. (2021). Anaplasma spp in dogs: Is there a danger for humans? *Revue Vétérinaire Clinique*, 56(4), 1-15.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anicom.2021.10.001>
- Guillemi, E. C., Tomassone, L., & Farber, M. D. (2015). Tick-borne Rickettsiales: Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.009>
- Harvey, J. W. (2012). Evaluation of Hemostasis: Coagulation and Platelet Disorders. En J. W. Harvey, *Veterinary Hematology* (págs. 191-233). W.B. Saunders.
- Harvey, J. W., Simpson, C. F., & Gaskin, J. M. (1978). Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 182-188. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182>
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., & Brouqui, P. (2001). Analysis of the 16S rRNA gene sequence of Anaplasma centrale and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 241-244. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.241-244.2001>
- Jimenez, I. A., Vega Mariño, P. A., Stapleton, G. S., Prieto, J. B., & Bowman, D. D. (2020). Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19, 100373. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100373>
- Lara, B., Conan, A., Thrall, M. A., Ketzis, J. K., Branford, G. C., & Rajeev, S. (2020). Serologic and molecular diagnosis of Anaplasma platys and Ehrlichia canis infection in dogs in an endemic region. *Pathogens*, 9(6), 1-9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060488>
- Li, H. t., Sun, L. s., Chen, Z. m., Hu, J. s., Ye, C. d., Jia, K., Wang, H., Yuan, L. g., Zhang, G. h., & Li, S. (2014). Detection of Anaplasma platys in dogs using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Veterinary Journal*, 199(3), 468-470. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.012>
- Maggi, R. G., & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1-37. [https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-3)
- McFee, R. B. (2018). Tick borne illness - Anaplasmosis. *Tick borne illness - Anaplasmosis*, 64(5), 181-184. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2018.01.005>
- Nascimento Ramos, R. A., Latrofa, M. S., Giannelli, A., Lacasella, V., Campbell, B. E., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2014). Detection of Anaplasma platys in dogs and Rhipicephalus sanguineus group ticks by a quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, 205(1-2), 285-288. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.023>

- Parola, P., Roux, V., Camicas, J. L., Baradji, I., Brouqui, P., & Raoult, D. (2000). Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(4), 707-708. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90243-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90243-8)
- Rar, V., Tkachev, S., & Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution*, 91(2021), 104833. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>
- Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 14(1), 4-7. <https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/article/view/501>
- Rivadeneira-Barreiro, P. E., Montes de Oca-Jiménez, R., Vázquez-Chagoyán, J. C., Martínez-Subiela, S., Morán-Loor, A., Ochoa-García, L., Zambrano-Rodríguez, P. C., Garg, N. J., & Varela-Guerrero, J. A. (2021). Trypanosoma cruzi co-infections with other vector borne diseases are frequent in dogs from the pacific coast of Ecuador. *Microbial Pathogenesis*, 155, 104884. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104884>
- Rucksaken, R., Maneeruttanarungroj, C., Maswanna, T., Sussadee, M., & Kanbutra, P. (2019). Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of Babesia canis, Hepatozoon canis, Ehrlichia canis, and anaplasma platys in Buriram Province, Thailand. *Veterinary World*, 12(5), 700-705. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.700-705>
- Rymaszewska, A., & Grenda, S. (2008). Anaplasma—characteristics of Anaplasma and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*, 11(11), 573-584. <https://doi.org/10.17221/1861-VETMED>
- 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. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Sambrook, J., & Rusell, D. W. (2001). *Molecular Clonig: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silaghi, C., Santos, A. S., Gomes, J., Christova, I., Matei, I. A., Walder, G., Domingos, A., Bell-Sakyi, L., Sprong, H., Von Loewenich, F. D., Oteo, J. A., De La Fuente, J., & Dumler, J. S. (2017). Guidelines for the Direct Detection of Anaplasma spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 12-22. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1960>
- Sykes, J. E., & Foley, J. E. (2013). Anaplasmosis. In J. E. Sykes, *Canine and Feline Infectious Diseases* (pp. 290-299). Saunders.
- Troncoso, I., Fischer, C., Villarroel, C., & Herzberg, D. (2014). Caso clínico Anaplasma phagocytophilum en un paciente canino. *Hospitales veterinarios*, 6(2), 41-46.

- Tu, G. (2005). ELECTROPHORESIS | Principles. En P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole, *Encyclopedia of Analytical Science* (págs. 363-370). Encyclopedia of Analytical Science.
- Valenciano, A. C., Cowell, R. L., Rizzi, T. E., & Tyler, R. D. (2014). Platelets. In A. C. Valenciano, R. L. Cowell, T. E. Rizzi, & R. D. Tyler, *Atlas of Canine and Feline Peripheral Blood Smears* (pp. 215-233). Elsevier Health Sciences.
- Ybañez, A. P., Ybañez, R. H., Yokoyama, N., & Inokuma, H. (2016). Multiple infections of *Anaplasma platys* variants in Philippine dogs. *Veterinary World*, 9(12), 1456-1460. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1456-1460>