

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Detección de *Anaplasmataceae* en garrapatas colectadas de perros y *Anaplasma platys* en muestras de sangre de perros de Costa Rica mediante la técnica de PCR

Leyda E. Ábrego Sánchez

Universidad Nacional, Heredia, Febrero de 2008

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al grado de *Magíster Scientiae*

Detección de *Anaplasmataceae* en garrapatas colectadas de perros y *Anaplasma platys* en muestras de sangre de perros de Costa Rica mediante la técnica de PCR

Leyda E. Ábrego Sánchez

Tesis presentada para optar al grado de Magíster Scientae en Enfermedades Tropicales. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Luis Nazario Araya Sánchez
Representante Consejo Central de Posgrado

Sandra Estrada König M.Sc.
Coordinadora PCVET

Gaby Dolz Wiedner, Ph.D.
Tutora

Marco Vinicio Herrero Acosta, Ph.D.
Lector

Ana E. Jiménez Rocha, M.Sc.
Lectora

Leyda Ábrego Sánchez
Sustentante

Resumen General

En el primer estudio se analizaron 165 garrapatas provenientes de 165 perros que asistieron a diferentes clínicas veterinarias de Costa Rica. Se identificaron 160 *Rhipicephalus sanguineus*, 4 *Amblyomma ovale* y 1 *Ixodes boliviensis*. *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* fueron detectados por PCR en 43 (26.06%) y 5 (3.03%) garrapatas *R. sanguineus* respectivamente, siendo éste el primer reporte de la presencia de estos agentes en garrapatas de Costa Rica. Dos garrapatas presentaron infecciones mixtas con *E. canis* y *A. platys*. Una garrapata positiva para cada uno de estos agentes fue secuenciada, encontrando una similitud de 99% para *E. canis* y de 98% para *A. platys*. No se detectó la presencia de *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii* en ninguna de las garrapatas analizadas. El análisis de regresión logística no reveló asociación con el sexo de la garrapata, la cantidad de garrapatas, la época de colecta, la raza y la edad del perro del cual se recolectaron las garrapatas con la presencia de *E. canis* y *A. platys*.

En el segundo estudio se analizaron 300 muestras sanguíneas provenientes de perros sospechosos de ehrlichiosis o trombocitopenia infecciosa cíclica atendidos en clínicas veterinarias mediante PCR. Un total de 19 (6.33%) muestras resultaron positivas a *A. platys*. Este hallazgo representa el primer reporte de la detección de *A. platys* en caninos en diferentes áreas geográficas (San José, Heredia, Alajuela, Cartago y Guanacaste) de Costa Rica. En 7 muestras caninas se encontró además infección mixta (*A. platys* y *E. canis*). Una muestra sanguínea positiva a *A. platys* fue secuenciada mostrando una similitud del 100%. No se determinó efecto significativo de las variables cualitativas (raza, sexo y edad del perro, ubicación de la clínica veterinaria y época de colecta de la muestra) y

cuantitativas resultado del hemograma (hematocrito, hemoglobina, leucocitos, linfocitos y número de segmentados) sobre la presencia de *A. platys*.

Agradecimientos

A Dios por haberme regalado la vida, guiarme, darme siempre las fuerzas para seguir adelante y abrirme las puertas para prepararme profesionalmente y lograr mis metas.

A Zeuz Capitan, por todo su apoyo incondicional, consejos, palabras de aliento, por cuidarme y compartir todos mis momentos de alegrías y tristezas.

Agradezco muy sinceramente a mi tutora la Dra Gaby Dolz por permitirme realizar mi tesis bajo su tutela brindándome tiempo, comprensión y dedicación. Además, por ser más que tutora una amiga.

A mis lectores M.Sc. Ana Jiménez y Dr. Marco Herrero, por estar siempre anuentes a escucharme, orientarme, apoyarme y ayudarme en mi trabajo de graduación.

A las Dras. Ana Meneses y Laura Bouza por su colaboración en la colecta de las muestras.

A los Dres. Bernardo Vargas, Juan José Romero y Mauricio Jiménez por contribuir con sus conocimientos y experiencia en la realización de este trabajo.

Al Dr. Victor Álvarez y a Vladimir Hernández del Ministerio de Agricultura y Ganadería, por su apoyo en la confirmación de la identificación de las especies de garrapatas colectadas.

A las Dras. Lizbeth Salazar y Melissa Carazo del Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA) por su apoyo en la secuenciación.

Al Dr. Luis Nazario Araya por brindarme su apoyo como miembro del Consejo Central de Posgrado.

Al Sr. Rodolfo Pereira por su amistad, apoyo y buenos consejos. Al Sr. Reynaldo Pereira por su amistad y desinteresada contribución con mi trabajo de tesis.

Al Sr. Carlos Perlaza, a la Dra Sandra Estrada, a Maribel Árias y a Gaby Campos por su apoyo.

Al Laboratorio de Zoonosis y a Rocío Cortés por su disposición para ayudarme en la realización de mi tesis.

A Rose Marie Hurtado por su apoyo con información necesaria para la ubicación de las clínicas veterinarias participantes en este estudio.

A todas los médicos veterinarios y clínicas, que colaboraron en la colecta de las muestras para este estudio, en especial a Bruce, Dra. Denis Aranda, Dr. Juan José Rodríguez y Dra. Johanne Herrera.

A mis amigos, Marlen Cordero y Francisco Montero por su amistad y apoyo incondicional.
A todas las hermanas que me tuvieron siempre presente en sus oraciones, en especial a la hermana Ana de Julio, Clara de Villalba y Gladys de Jiménez.
Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) En especial a la Sra. Neddy Zamora y a la Sra. Irena Rusak-Rojas por el soporte económico de mis estudios de maestría.
Además por la oportunidad de realizar pasantía en Alemania.
Al proyecto de investigación 245119 de la Universidad Nacional y Fondo de Educación Superior, CONARE.

Dedicatoria

A mi padre Roberto Ábrego por su amor, consejos y apoyo incondicional. A mi madre Aracelys de Ábrego por todas sus oraciones y consejos que solo salen del corazón de una madre.

A mis hermanas Feny, Nuvia y Sandra por sus consejos y palabras de aliento para seguir adelante con mis estudios.

A mis sobrinos Gisselle, Fernando, Melissa y Madeleine por su amor y buenos deseos.

A mi abuelo Ignacio Sánchez y mi tía Virginia Sánchez por estar pendientes de mí y desearme siempre lo mejor.

Índice

| | |
|----------------------------|-------|
| Resumen General | v |
| Agradecimientos | vii |
| Dedicatoria | ix |
| Índice de Cuadros | xii |
| Índice de Figuras | xix |
| Introducción General | xvi |
| Referencias Bibliográficas | xxiii |

Artículo I

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Metodología | 5 |
| 2.1. Tipo de estudio | 5 |
| 2.2. Colecta e identificación de garrapatas | 5 |
| 2.3. Reacción en cadena de la polimerasa | 6 |
| 2.3.1. Extracción de ADN | 6 |
| 2.3.2. PCR para <i>Anaplasmataceae</i> | 6 |
| 2.3.3. PCR para <i>Ehrlichia</i> spp | 7 |
| 2.3.4. PCR para <i>Anaplasma platys</i> | 8 |
| 2.4. Secuenciación | 10 |
| 2.5. Análisis estadístico | 11 |
| 2.5.1. Análisis descriptivo | 11 |
| 2.5.2. Regresión logística | 12 |
| 3. Resultados | 13 |
| 4. Discusión | 21 |
| 5. Conclusiones | 22 |
| 6. Recomendaciones | 23 |
| 7. Referencias Bibliográficas | 24 |

Artículo II

| | |
|--|----|
| Resumen | 28 |
| Abstract | 29 |
| 1. Introducción | 30 |
| 2. Metodología | 32 |
| 2.1. Tipo de estudio y tamaño de muestra | 32 |
| 2.2. Reacción en cadena de la polimerasa | 33 |
| 2.2.1. Extracción de ADN | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2. PCR para <i>Anaplasmataceae</i> | 33 |
| 2.2.3. PCR para <i>Anaplasma platys</i> | 34 |
| 2.3. Secuenciación | 35 |
| 2.4. Análisis estadístico | 36 |
| 3. Resultados | 37 |
| 4. Discusión | 42 |
| 5. Conclusiones | 43 |
| 6. Recomendaciones | 44 |
| 7. Referencias Bibliográficas | 45 |
| Anexo | 48 |

Índice de Cuadros

Artículo I

| | | |
|-----------|---|----|
| Cuadro 1. | Cebadores utilizados en los PCR realizados en el presente estudio. | 9 |
| Cuadro 2. | Variables y categorías analizadas en el análisis estadístico descriptivo. | 11 |
| Cuadro 3. | Agrupación de las razas de perros participantes en el estudio según el largo del pelo. | 12 |
| Cuadro 4. | Frecuencia y porcentaje de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectadas con <i>Anaplasmataceae</i> , <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Anaplasma platys</i> , según estadio y sexo de las garrapatas. | 15 |
| Cuadro 5. | Frecuencia y porcentaje de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> positivas por provincia | 15 |
| Cuadro 6. | Resultados obtenidos en los PCR para <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Anaplasma platys</i> comparados con los resultados obtenidos en el PCR para familia <i>Anaplasmataceae</i> . | 16 |
| Cuadro 7. | Frecuencia de garrapatas positivas a <i>E. canis</i> y <i>A. platys</i> en base a las características de los perros de los cuales se colectaron las garrapatas. | 19 |
| Cuadro 8. | Análisis de regresión logística del efecto de las variables independientes estudiadas sobre la presencia de <i>E. canis</i> en garrapatas. | 20 |
| Cuadro 9. | Análisis de regresión logística del Efecto de las variables independientes estudiadas sobre la presencia de <i>A. platys</i> en garrapatas. | 20 |

Artículo II

| | | |
|-----------|--|----|
| Cuadro 1. | Cebadores utilizados en los PCR realizados en el presente estudio | 35 |
| Cuadro 2. | VARIABLES Y CATEGORÍAS ANALIZADAS ESTADÍSTICAMENTE. | 36 |
| Cuadro 3. | Agrupación de las razas de perros según el largo del pelo. | 37 |
| Cuadro 4. | Comparación de resultados obtenidos en el PCR para <i>Anaplasmataceae</i> y el PCR para <i>A. platys</i> en el análisis de 300 sueros caninos. | 40 |
| Cuadro 5. | Características de los perros positivos a <i>A. platys</i> mediante PCR. | 40 |
| Cuadro 6. | Resultados del análisis estadístico de las variables cualitativas de los perros positivos a <i>A. platys</i> . | 41 |
| Cuadro 7. | Resultado del análisis estadístico de las variables cuantitativas del hemograma de perros positivos y negativos a <i>A. platys</i> . | 41 |

Índice de Figuras

Artículo I

- Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR para *Anaplasmataceae*, *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *A. platys*. 14
- Figura 2. Comparación de la secuencia de *E. canis* obtenida de *R. sanguineus* de Costa Rica (Query) con el genoma de *E. canis* obtenido de un perro de EEUU (Sbjct). 17
- Figura 3. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región 16S ARNr de la muestra de *A. platys* obtenida de *R. sanguineus* de Costa Rica (*A.platys_garrap*) y la secuencia de este gen de *A. platys* depositado en el GenBank (*A._platys_16S_A*). 18

Artículo II

- Figura 1. Electroforesis de gel de agarosa de los productos de los PCR mostrando la presencia de *Anaplasmataceae* 38
- Figura 2. Alineamiento de la secuencia de una muestra de *A. platys* obtenida de un perro de Costa Rica (secuencia *A. platys*_sangre) y la secuencia del plásmido del gen 16S ARNr de *A. platys* depositados en el Genbank (*A. platys*_16S_ARNr) utilizando el programa ClustalW2. 39

Introducción General:

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de vertebrados durante todos los estadios de su ciclo vital y se ubican dentro de la clase Arácnida, subclase Acari, suborden Ixodida, orden parasitiforme. Dentro de éste se encuentran los Ixodidae (garrapatas duras), que es la familia más importante en términos numéricos (13 géneros y 694 especies) y en importancia médica, debido al papel que juegan en la transmisión de agentes patógenos. Las especies de garrapatas de perros de importancia médica y veterinaria se encuentran principalmente dentro de los géneros *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp. y *Rhipicephalus* spp. (Black IV y Piesman, 1994; Parola y Raoult, 2001; Wall y Shearer, 2001; Sonenshine *et al.*, 2002).

Entre los agentes patógenos transmitidos por garrapatas se encuentran las bacterias intracelulares de la familia *Anaplasmataceae*. Esta familia actualmente consiste de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella*, *Wolbachia* y ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ (Dumler *et al.*, 2001; Kawahara *et al.*, 2004). Todos los miembros de esta familia son bacterias pleomórficas, gram negativas, intracelulares obligadas; pertenecientes al subgrupo α -*Proteobacteria* y se replican dentro de una vacuola derivada de la membrana de la célula eucariota del hospedero, vertebrado o invertebrado (Rikihisa, 1991; Chen *et al.*, 1994; Dumler *et al.*, 2001; Harrus *et al.*, 2004; Songer y Post, 2005; Rar *et al.*, 2005; Naitou *et al.*, 2006).

Los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* infectan principalmente células hematopoyéticas, causando ehrlichiosis y anaplasmosis en humanos, perros, ganado, caballos y otros animales silvestres (Rikihisa, 1991; Chen *et al.*, 1994; Dumler, 2005).

Infecciones emergentes se han reportado en humanos con *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia canis*. Este último ha sido reportado en un caso aislado en Venezuela. En perros han sido reportados *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* y *A. phagocytophilum* (Pérez *et al.*, 1996, Branger *et al.*, 2004; Sarih *et al.*, 2005; Dumler, 2005; Oteo and Brouqui, 2005; Kawahara *et al.*, 2006).

E. canis es el agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina (EMC) y fue descrito por primera vez en perros en Argelia en 1935 (Donatien y Lestoquard, 1935). También se ha reportado en perros del este de Africa (Kaminjolo *et al.*, 1976; Brouqui *et al.*, 1991), Egipto (Botros *et al.*, 1995), Israel (Keysary *et al.*, 1996), Venezuela (Unver *et al.*, 2001), España (Aguirre *et al.*, 2004), Camerún (Ndip *et al.*, 2005), Zimbawe (Kelly *et al.*, 2004) y Brasil (Moreira *et al.*, 2003, Dagnone *et al.*, 2003, Macieira *et al.*, 2005, Aguiar *et al.*, 2007; Labruna *et al.*, 2007) y en Costa Rica (Meneses, 1995; Rímolo, 2006). En humanos, además del reporte de Venezuela (Pérez *et al.*, 1996), existe evidencia serológica en Argentina (Ripoli *et al.*, 1999) y Brasil (Calic *et al.*, 2004). *E. canis* es transmitido principalmente por *Rhipicephalus sanguineus* (Groves *et al.*, 1975), pero se ha logrado también transmisión experimental con *Dermacentor variabilis* (Johnson *et al.*, 1998). La transmisión de este agente en la garrapata *R. sanguineus* ocurre transestadialmente (Smith *et al.*, 1976). *E. canis* se ha detectado en *R. sanguineus* colectada de perros en Estados Unidos (Murphy *et al.*, 1998), Venezuela (Unver *et al.*, 2001), Brasil (Aguiar *et al.*, 2007) y Camerún (Ndip *et al.*, 2007). La EMC se manifiesta con síntomas como fiebre, depresión, anorexia y pérdida de peso en la fase aguda, encontrando en el laboratorio trombocitopenia, leucopenia, ligera anemia e hipergamaglobulinemia. La fase crónica se caracteriza por hemorragia, epistaxis y edema (Huxsoll *et al.*, 1969; Ristic *et al.*, 1972; Simpson, 1974;

Rikihisa, 1991; Iqbal *et al.*, 1994; Harrus *et al.*, 1997; Harrus *et al.*, 1999; Harrus *et al.*, 2004; Songer y Post, 2005).

E. chaffeensis fue diagnosticado por primera vez en humanos en Estados Unidos en 1987 (Maeda *et al.*, 1987). Sin embargo, no fue hasta 1991 que fue reconocido como la causa de ehrlichiosis monocítica humana y llamada *E. chaffeensis* (Dawson *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1992). La mayoría de los casos de ehrlichiosis monocítica humana se han reportado en Estados Unidos (Eng *et al.*, 1990; Fishbein *et al.*, 1994; McQuiston *et al.*, 1999). Pacientes con anticuerpos contra *E. chaffeensis* han sido reportados además en Portugal (Morais *et al.*, 1991), Mali (Uhaa *et al.*, 1992), Tailandia (Heppner *et al.*, 1997), Italia (Nutti *et al.*, 1998; Santino *et al.*, 1998), Argentina (Ripoli *et al.*, 1999), Israel (Keysary *et al.*, 1999), México (Gongora-Biachi *et al.*, 1999), Rusia (Ravyn *et al.*, 1999), China (Cao *et al.*, 2000), Japón (Shibata *et al.*, 2000) y Korea (Sachar, 2000). Estos hallazgos serológicos se deben de interpretar con cuidado, ya que se ha demostrado que ocurren reacciones cruzadas con otras especies del género *Ehrlichia* (Paddock y Childs, 2003). Se cree que el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es el reservorio natural de *E. chaffeensis* (Lockhart *et al.*, 1997), pero muchas especies de vertebrados pueden servir como reservorios, entre ellos el perro (Paddock y Childs, 2003). *Amblyomma americanum* ha sido reportado como el principal vector de *E. chaffeensis* y su presencia está restringida a Norte América (Anderson *et al.*, 1993; Ijdo *et al.*, 2000). Se ha confirmado que hay transmisión transestadial de *E. chaffeensis* en *A. americanum* (Ewing *et al.*, 1995); sin embargo, no se ha demostrado que exista transmisión transovárica (Walker *et al.*, 2004). También se ha encontrado en *R. sanguineus* (Ndip *et al.* 2007), *D. variabilis* (McQuiston *et al.*, 1999), *Ixodes pacificus* (Kramer *et al.*, 1999), *I. ricinus* (Alekseev *et al.*,

2001), *I. ovatus* (Shibata *et al.*, 2000), *Amblyomma testudinarium* y *Haemaphysalis yeni* (Cao *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005). En China se realizó un estudio con garrapatas *H. longicornis* colectadas de perros, en las que se reportó la presencia de *E. chaffeensis* mediante PCR y secuenciación (Lee *et al.*, 2005). El papel de estas otras garrapatas como vectores naturales de *E. chaffeensis* no ha sido establecido aún de forma definitiva (Paddock y Childs, 2003). *E. chaffeensis* produce ehrlichiosis monocítica en humanos, la cual es una enfermedad aguda caracterizada por manifestaciones clínicas no específicas, presentando principalmente fiebre, dolor de cabeza, escalofrío, anorexia, vómitos y en algunos casos leucopenia, trombocitopenia y un elevado nivel de aminotransferasa hepática (Paddock y Childs, 2003; Walker *et al.*, 2004). En perros naturalmente infectados no se han podido determinar signos clínicos significantes; sin embargo, un reporte de tres perros naturalmente infectados con *E. chaffeensis* documentó serios signos incluyendo vómitos, epistaxis, linfadenomegalia y uveítis (Breitschwerdt *et al.*, 1998, Harrus *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004; Songer y Post, 2005).

E. ewingii es el agente etiológico de la ehrlichiosis granulocítica canina (EGC) y fue descubierta en perros en el año de 1971 en Estados Unidos. No fue hasta 1985, se le consideró como una especie distinta, ya que inicialmente se pensó que era una cepa menos virulenta de *E. canis* (Ewing *et al.*, 1971; Stockham *et al.*, 1985). La ehrlichiosis granulocítica canina ha sido reportada en Estados Unidos (Stockham *et al.*, 1992; Rikihisa *et al.*, 1994; Greig *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1998; Breitschwerdt *et al.*, 1998; Liddell *et al.*, 2003) y recientemente en Camerún (Ndip *et al.*, 2005). Infecciones naturales han sido confirmadas en ciervos (*Odocoileus virginianus*), los cuales pueden ser importantes reservorios de este agente (Yabsley *et al.*, 2002). En 1999, *E. ewingii* fue reportado por

primera vez en cuatro pacientes causando ehrlichiosis en humanos en Estados Unidos (Buller *et al.*, 1999). Este agente ha sido identificado en varias garrapatas colectadas de perros, incluyendo *R. sanguineus*, *A. americanum* y *D. variabilis* (Murphy *et al.*, 1998; Ndip *et al.*, 2007). De estas especies de garrapatas, solo *A. americanum* ha sido confirmada como vector de *E. ewingii* (Anziani *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2000). Los perros infectados con este agente presentan principalmente fiebre y trombocitopenia, pero también pueden mostrar ataxia y paresis. La fase crónica ha sido asociada además con poliartritis (Ewing *et al.*, 1971; Stockham *et al.*, 1992; Liddell *et al.*, 2003; Harrus *et al.*, 2004; Songer y Post, 2005). En el primer caso de este agente en humanos se reportó fiebre, dolor de cabeza, trombocitopenia y leucopenia (Buller *et al.*, 1999).

A. platys, causante de la trombocitopenia cíclica canina (CICT) fue reportado en perros por primera vez en 1978 en Estados Unidos (Harvey *et al.*, 1978). También ha sido detectado en perros de Grecia (Kontos *et al.*, 1991), China (Chang y Pan, 1996), Japón (Inokuma *et al.*, 2001; Motoi *et al.*, 2001; Unver *et al.*, 2003), Tailandia (Suksawat *et al.*, 2001), Australia (Brown *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005), España (Sainz *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2006), Francia (Beaufils *et al.*, 2002), Italia (de la Fuente *et al.*, 2006) y Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). *A. platys*, anteriormente reconocido como miembro del género *Ehrlichia* (*E. platys*), pasó a formar parte del género *Anaplasma* a partir del 2001 (Dumler *et al.*, 2001). Se asume que *A. platys* es transmitido por *R. sanguineus*, aunque estudios experimentales para probar este modo de infección han fallado (Simpson *et al.*, 1991). La detección de *A. platys* en *R. sanguineus* de perro en Japón muestra evidencia adicional (Inokuma *et al.*, 2000; Motoi *et al.*, 2001).

La CICT causada por *A. platys* no es considerada como una infección grave para perros. Al parecer infecta solamente plaquetas y la fase aguda de la infección se caracteriza por trombocitopenia cíclica ocurriendo rara vez hemorragia. Sin embargo, trabajos realizados en Estados Unidos (Wilson, 1992) y en Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2003) han reportado signos clínicos de mayor severidad, similares a aquellos asociados a infecciones con *E. canis*: disfunción de plaquetas, anemia, leucopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia.

Para la detección de agentes patógenos en garrapatas se realizan diferentes técnicas. Una técnica es la observación de la hemolinfa, que consiste en colocar la hemolinfa de la garrapata en un portaobjeto, realizar la tinción con Giemsa o Giménez y observar al microscopio con aceite de inmersión. Esta técnica se utiliza desde hace varios años para la búsqueda de agentes *Rickettsiales*, mostrando las siguientes ventajas: técnica sencilla, barata, rápida y de fácil aplicación en campo para la clasificación preliminar de agentes *Rickettsiales* en garrapatas. Sin embargo, no es útil para determinar la especie presente, para ésto se utilizan pruebas inmunoenzimáticas (ELISA), inmunofluorescentes (IF) (Burgdorfer, 1970; Parola y Raoult, 2001) o pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Robertson *et al.*, 1973; Higgins y Azad, 1995). En un estudio realizado en Croacia se compararon varios métodos para determinar la presencia de agentes *Rickettsiales* en garrapatas, determinando el método de inmunoensayo enzimático de captura de antígeno y el PCR como técnicas más sensibles que la observación de la hemolinfa, que arrojó un gran número de falsos negativos (Radulovic *et al.*, 1994). La técnica molecular PCR tiene la ventaja de ser reproducible entre laboratorios, en comparación con otros métodos, que dependen de la habilidad y experiencia del observador

(hemolinfa) y la obtención de anticuerpos monoclonales (ELISA, IF). Mediante PCR se puede diferenciar entre especies, utilizando la secuencia de cebadores específicos y además permite la caracterización de microorganismos que no pueden ser cultivados (Higgins y Azad, 1995). En un estudio de ehrlichiosis realizado en Estados Unidos se encontró que una muestra considerada positiva a *E. canis* por inmunofluorescencia directa era en realidad *E. chaffeensis* al analizarla mediante PCR (Anderson *et al.*, 1992).

Rhipicephalus sanguineus es la garrapata más común y la que se ha encontrado con mayor frecuencia infestando al perro en Costa Rica, también se han encontrado esporádicamente: *A. cajennense*, *A. maculatum*, *A. ovale*, *A. pecarium*, *I. boliviensis* y *Boophilus microplus* (Álvarez *et al.*, 2005). En *R. sanguineus* se han detectado mediante PCR *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *A. platys* (Murphy *et al.*, 1998; Inokuma *et al.*, 2000; Ndip *et al.*, 2007).

En Costa Rica se han realizado únicamente dos trabajos en garrapatas, en uno se detectó *Rickettsia rickettsii* en garrapatas de conejos (*Haemaphysalis leporispalustris*) (Fuentes *et al.*, 1985) y en el otro, *Anaplasma marginale* en garrapatas de bovinos (*Boophilus microplus*) (Hermans *et al.*, 1994). Hasta la fecha no se han realizado estudios de agentes patógenos en garrapatas de perros, como animal frecuentemente más cercano al hombre.

Referencias Bibliográficas:

- Aguiar, D. M., G. T. Cavalcante, A. Pinter, S. M. Gennari, L. M. Camargo and M. B. Labruna. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J. Med. Entomol.* 44(1):126-132.
- Aguirre, E., A. Sainz, S. Dunne, I. Amusatagu, L. Lopez, F. Rodriguez-Franco, I. Luaces, O. Cortes and M. A. Tesouro, 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet. Parasitol.* 125: 365–372.
- Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, A. V. Semenov and C. V. Bolshakov. 2001. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol.* 38:471–474.
- Álvarez, V., Hernández V, Hernández J. 2005. Catálogo de garrapatas suaves (Acari: Argasidae) y duras (Acari: Ixodidae) de Costa Rica. *BRENESIA*, 63(64):81-88.
- Anderson, B. E., J. E. Dawson, D. C. Jones and K. H. Wilson. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29(12):2838-2842.
- Anderson, B. E., J. W. Summer, J. E. Dawson, T. Tzianabos, C. R. Greene, J. G. Olson, D. B. Fishbein, M. Olsen-Rasmussen, B. P. Holloway, E. H. George and A. F. Azad. 1992. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:775-780
- Anderson, B. E., K. G. Sims, J. G. Olson, J. E. Childs, J. F. Piesman, C. M. Happ, G. O. Maupin and B. J. Johnson. 1993. *Amblyomma americanum*: A potential vector of human ehrlichiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:239–244.
- Anziani, O. S., S. A. Ewing, and R. W. Barker. 1990. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. *Am. J. Vet. Res.* 51:929–931.
- Arraga-Alvarado, C., M. Palmar, O. Parra and P. Salas. 2003. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. *Vet. Pathol.* 40:149-156.
- Beaufils, J. P., H. Inokuma, J. Martin-Granel, P. Jumelle, M. Barbault-Jumell and P. Brouqui. 2002. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. *Rev. Med. Vet.* 153:85-90.
- Black IV, W. C. and J. Piesman. 1994. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10034-10038.

- Botros, B.A., M. S. Elmolla, A. W. Salib, C. A. Calamaio, G. A. Dasch and R. R. Arthur. 1995. Canine ehrlichiosis in Egypt: seroepidemiological survey. Onderstepoort J. Vet. Res. 62: 41-43.
- Branger, S., J.M. Rolain and D. Raoult. 2004. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia Chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. Antimicrob. Agents Chemother. 48(12):4822-4828.
- Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty and S. I. Hancock. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J. Clin. Microbiol. 36:2645–2651.
- Brouqui, P., B. Davoust., S. Haddad, , E. Vidor and D. Raoult. 1991. Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Island. Vet. Microbiol. 26:103-105.
- Brown, G. K., A. R. Martin, T. K. Roberts and R. J. Aitken. 2001. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust. Vet. 79:554-558.
- Buller, R. S., M. Arens, S. P., Hmiel, C. D. Paddock, J. W. Sumner, Y. Rikihisa, A. Unver, M. Gaudreault-Keener, F. A. Manian, A. M. Liddell, N. Schmulewitz and G. A. Storch. 1999. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. 341:148–155.
- Burgdorfer, W. 1970. Hemolymph test : A technique for detection of Rickettsiae in ticks. Am. J. Trop Med. Hyg. 19(6):1010-1014
- Calic, S. B., M. A. Galvão, F. Bacellar, C. M. Rocha, C. L. Mafra, R. C. Leite, D. H. Walker. 2004. Human ehrlichioses in Brazil: First suspect cases. Brazil J. Infect. Dis. 8: 259–262.
- Cao, W. C., Y. M. Gao, P. H. Zhang, X. T. Zhang, Q. H. Dai, J. S. Dumler, L. Q. Fang and H. Yang. 2000. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from southern China. J. Clin. Microbiol. 38:2778–2780.
- Chang, W. L. and M. J. Pan. 1996. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. J. Clin. Microbiol. 34:3142-3146.
- Chen, S-M., J. S. Dumler, J. S. Bakken and D. H. Walker. 1994. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. 32(3):589-595.
- Dagnone, A.S., H. S. M. Autran, M. C. Vidotto, F.S. Jojima and O. Vidotto. 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tickinfested dogs from a hospital population in south Brazil. Vet. Parasitol. 117:285–290.
- Dawson, J. E., B. E. Anderson, D. B. Fishbein, J. L. Sanchez, C. S. Goldsmith, K. H. Wilson, and C. W. Duntley. 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia*

- sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2741-2745.
- De La Fuente, J., A. Torina, V. Naranjo, S. Nicosia, A. Alongi, F. La Mantia and K. M. Kocan. 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research.* 2:24.
- Donatien, A., and F. Lestoquard. 1935. Existence in Algeria d'une Rickettsia du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exctique* 28:418-419.
- Dumler, J. S. 2005. *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063:361-373.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales* : Unification of some species of *Ehrlichia* and *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
- Eng, T. R., J. R. Harkess, D. B. Fishbein, J. E. Dawson, C. N. Greene, M. A. Redus and F. T. Satalowich. 1990. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. *JAMA* 264:2251–2258.
- Ewing, S. A., J. E. Dawson, A. A. Kocan, R. W. Barker, C. K. Warner, R. J. Panciera, J. C. Fox, K. M. Kocan and E. F. Blouin. 1995. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32:368–374.
- Ewing, S. A., W. R. Roberson, R. G. Buckner and C. S. Hayat. 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159:1771–1774.
- Fishbein, D. B., J. E. Dawson and L. E. Robinson. 1994. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann. Intern. Med.* 120:736–743.
- Fuentes, L., A. Calderón and L. Hung. 1985. Isolation and identification of *Rickettsia rickettsii* from the rabbit ticks (*Haemaphysalis leporispalustris*) in the Atlantic zone of Costa Rica. *Amp. J. Trop. Med. Hyg.* 34(3):564-567
- Gongora-Biachi, R. A., J. Zavala-Velazquez, C. J. Castro-Sansores and P. Gonzalez-Martinez. 1999. First case of human ehrlichiosis in Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 5:481.
- Greig, B., K. M. Asanovich, P. J. Armstrong and J. S. Dumler. 1996. Geographic, clinical serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in minnesota and wisconsin dogs. *J. Clin. Microbiol.* 34(1):44-48.

- Groves, M. G., G. L. Dennis, H. L. Amyx, and D. L. Huxsoll. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36:937–940.
- Harrus, S., T. Waner, H. Bark, F. Jongejan And A. W. C. A. Cornelissen. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37(9):2745-2749.
- Harrus, S., T. Waner, and H. Bark. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis—an update. *Comp. Cont. Ed. Prac. Vet.* 19:431–444.
- Harrus, S., T. Waner, S. Mahan and H. Bark. 2004. Rickettsiales. p. 425-444. *In* Gyles, C. L., J. F. Prescott, J. G. Songer and C.O. Thoen. Pathogenesis of bacterial infection in animals. Blackwell Publishing, USA.
- Harvey, J. W., C. F. Simpsons and J. M. Gaskin. 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsialike agent in dogs. *J. Infect. Dis.* 137:182-188.
- Heppner, D. G., C. Wongsrichanalai, D. S. Walsh, P. McDaniel, C. Eamsila, B. Hanson and H. Paxton. 1997. Human ehrlichiosis in Thailand. *Lancet* 350:785–786.
- Hermans, P., R. H. Dwinger, G. M. Buening and M. V. Herrero. 1994. Seasonal incidence and haemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. *Biol. Trop.* 42(3):623-632.
- Higgins, J. A. and A. F. Azad. 1995. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: A review. *J. Med. Entomol.* 32(3): 1010-1014.
- Huang, H., A. Unver, M. J. Pérez, N. G. Orellana and Y. Rikihisa. 2005. Prevalence and molecular analisis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz. J. Microbiol.* 36:211-216.
- Huxsoll, D. L., P. K. Hildebrandt, R. M. Nims, J. A. Ferguson and J. S. Walker. 1969. *Ehrlichia canis*-the causative agent of a hemorrhagic disease of dogs? *Vet. Rec.* 85:589.
- Ijdo, J. W., C. Wu, L.A. Magnarelli, K. C. Stafford III, J. F. Anderson and E. Fikrig. 2000. Detection of *Ehrlichia Chaffensis* DNA in *Amblyomma americanum* ticks in connecticut and Rhode Island. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4655-4656.
- Inokuma, H., D. Raoult and P. Brouqui. 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown Dog ticks (*Ripicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38(11):4219-4221.
- Inokuma, H., K. Ohno, T. Onishi, D. Raoult and P. Brouqui. 2001. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi an Okinawa Prefecture. *Jpn. J. Vet. Med. Sci.* 63:815-817.

- Iqbal Z., W. Chaichanasiriwithaya and Y. Rikihisa. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32(7):1658-1662.
- Johnson, E. M., S. A. Ewing, R. W. Barker, J. C. Fox, D. W. Crow, and K. Kocan. 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 74:277–288.
- Kaminjolo, J. S., M. B. Nyindo, P. D. Sayer, F. Rurangirwa, L.W. Johnson, S. F. Hird, E. Rosenbaum, L. L. Maxie and J. S. Ogaa. 1976. Identification of *Ehrlichia canis* in East Africa. *Vet. Rec.* 99:434-435.
- Kawahara, M., Y. Rikihisa, E. Isogai, M. Takahashi, H. Misumi, C. Suto, S. Shibata, C. Zhang and M. Tsuji. 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1837-1843.
- Kawahara, M., Y. Rikihisa, Q. Lin, E. Isogai, K. Tahara, A. Itagaki, Y. Hiramitsu and T. Tajima. 2006. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in deer and ticks on two Major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2):1102-1109.
- Kelly, P.J., G. N. Eoghain, D. Raoult. 2004. Antibodies reactive with *Bartonella henselae* and *Ehrlichia canis* in dogs from the communal lands of Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 75:116–120.
- Keysary, A., L. Amram, G. Keren, Z. Sthoeger, I. Potasman, A. Jacob, C. Strenger, J. E. Dawson, T. Waner. 1999. Serologic evidence of human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 5:775–778.
- Keysary, A., T. Waner, M. Rosner, C. K. Warner, J. E. Dawson, R. Zass, K. L. Biggie and S. Harrus. 1996. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet. Parasitol.* 62:331-340.
- Kontos, V. I., O. Papadopoulos and T. W. French. 1991. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet. Clin. Pathol.* 20:101-105.
- Kramer, V. L., M. P. Randolph, L. T. Hui, W. E. Irwin, A. G. Gutierrez and D. J. Vugia. 1999. Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:62–65.
- Labruna, M. B., J. W. McBride, L. M. A. Camargo, D. M. Aguiar, M. J. Yabsley, W. R. Davidson, E. Y. Stromdahl, P. C. Williamson, R. W. Stich, S. Wesley, E. P. Camargo and D. H. Walker. 2007. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet. Parasitol.* 143:189-195.

- Lee, S. O., D. K. Na, C. M. Kim, Y. H. Li, Y. H. Cho, J. H. Park, J. H. Lee, S. K. Eo, T. A. Klein and J. S. Chae. 2005. Identification and prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* infection in *Haemaphysalis longicornis* ticks from Korea by PCR, sequencing and phylogenetic analysis based on rRNA gene. *J. Vet. Sci.* 6(2):151-155.
- Liddell, A. M., S.L. Stockham, M. A. Scott, J. W. Sumner, C. D. Paddock, M. Gaudreault-Keener, M. Q. Arens and G. A. Storch. 2003. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4617-4622.
- Lockhart, J. M., W. R. Davidson, D. E. Stallknecht, J. E. Dawson, and E. W. Howerth. 1997. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. *J. Clin. Microbiol.* 35:1681-1686.
- Macieira, D.B., J. B. Messick, A. M. Cerqueira, I. M. Freire, G. F. Linhares, N. K. Almeida, N. R. Almosn, 2005. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Clin. Pathol.* 34:44-48.
- Maeda, K. N. Markowitz, R. C. Hawley, M. Ristic, D. Cox and J. E. McDade. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 316:853-856.
- Martin, A. R., G. K. Brown, R. H. Dunstan and T. K. Roberts. 2005. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp. Parasitol.* 109(3):176-180.
- McQuiston, J. H., C. D. Paddock, R. C. Holman, and J. E. Childs. 1999. The human ehrlichioses in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:635-642.
- Meneses, A. 1995. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *Vet Rec* 137:46-47.
- Morais, J. D., J. E. Dawson, C. Greene, A. R. Filipe, L. C. Galhardas and F. Bacellar. 1991. First European case of ehrlichiosis. *Lancet.* 338:633-634.
- Moreira, S.M., C.V. Basto, R. B. Araujo, M. Santos and L. M. F. Passos. 2003. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in BeloHorizonte, MG, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 55:141-147.
- Motoi, Y., H. Satoh, H. Inokuma, T. Kiyuuna, Y. Muramatsu, H. Ueno and C. Morita. 2001. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol.* 45(1):89-91.
- Murphy, G. I., S. A. Ewing, L. C. Whitworth, J. C. Fox and A. A. Kocan. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79:325-339.
- Naitou, H., D. Kawaguchi, Y. Nishimura, M. Inayoshi, F. Kawamori, T. Masuzawa, M. Hiroi, H. Kurashige, H. Kawabata, H. Fujita and N. Ohashi. 2006. Molecular identification of *Ehrlichia* species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' from

- ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol. Immunol.* 50(1):45-51.
- Ndip, L. M., R. N. Ndip, S. N. Esemu, V. L. Dickmu, E. B. Fokam, D. H. Walker and J. W. McBride. 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* 111:59-66.
- Ndip, L. M., R. N. Ndip, V. E. Ndivi, J. A. Awuh, D. H. Walker and J. W. McBride. 2007. *Ehrlichia* species in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Cameroon. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 7(2):1-7.
- Nuti, M., D. A. Serafini, D. Bassetti, A. Ghionni, F. Russino, P. Rombola, G. Macri and E. Lillini. 1998. Ehrlichia infection in Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 4:663–665.
- Oteo, J. A. and Brouqui P. 2005. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23(69):375-380.
- Paddock, C. D. and J. E. Childs. 2003. *Ehrlichia chaffeensis* : A prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1):37-64.
- Parola, P. and D. Raoult. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans : an emerging infectious threat. *Clin Infect. Dis.* 32:897–928.
- Pérez, M., Y. Rikihisa and B. Wen. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34:2133–2139.
- Radulovic, S., H. M. Feng, P. Crocquet-Valdes, M. Morovic, B. Dzelalija and D. H. Walker. 1994. Antigen-capture enzyme immunoassay: a comparison with other methods for detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks. *Am. J. Trop Med. Hyg.* 50(3):359-364
- Rar, V. A., N. V. Fomenko, A. K. Dobrotvorsky, N. N. Livanova, S. A. Rudakova, E. G. Fedorov, V.B. Astanin and O. V. Morozova. 2005. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Rusia. *Emerg. Infect. Dis.* 11(11):1708-1715.
- Ravyn, M. D., E. I. Korenberg, J. A. Oeding, Y. V. Kovalevskii, and R. C. Johnson. 1999. Monocytic Ehrlichia in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia. *Lancet* 353:722–723.
- Rikihisa, Y. 1991. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(3):286-308.
- Rikihisa, Y., S. A. Ewing and J. C. Fox. 1994. Western immunoblot of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. *J. Clin. Microbiol.* 32:2107–2112.

- Rímolo, M. 2006. Prevalencia serológica y citológica de la ehrlichiosis canina en Costa Rica (Tesis). Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional, 32p.
- Ripoli, C.M., C. E. Remondegui, G. Ordonez., R. Arazamendi, H. Fusaro, M. J. Hyman, C. D. Paddoc, S. R. Zak, J. G. Olson, C. A. Santos-Buch. 1999. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:350–354.
- Ristic, M., D. L. Huxsoll, R. M. Weisiger, P. K. Hildebrandt and M. B. A. Nyindo. 1972. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect. Immunity.* 6(3):226-231.
- Robertson, R. G. and C. L. Wisseman. 1973. Tickborne rickettsiae of spotted fever group in West Pakistan and Thailand: evidence for two new species. *Am. J. Epidemiol* 97:55-64
- Sachar, D. S. 2000. *Ehrlichia chaffeensis* infection in an active duty soldier stationed in Korea. *Medical Surveillance Monthly Report* 6:9–11.
- Sainz, A., I. Amusatogui and M. A. Tesouro. 1999. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11(4):382-384.
- Santino, I., A. Iori, R. Sessa, C. Sulli, G. Favia, M. Del Piano, H. W. Horowitz, E. Kilchevsky, S. Haber, M. Aguero-Rosenfeld, R. Kranwinkel, E. K. James, S. J. Wong, F. Chu, D. Liveris and I. Schwartz. 1998. *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Ehrlichia chaffeensis* in the National Park of Abruzzo. *FEMSMicrobiol. Lett.* 164:1–6.
- Sarih, M'H., Y. M'Ghirbi, A. Bouattour, L. Gern, G. Baranton and D. Posti. 2005. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *J. Clin. Microbiol.* 43(3):1127-1132.
- Shibata, S., M. Kawahara, Y. Rikihisa, H. Fujita, Y. Watanabe, C. Suto, and T. Ito. 2000. New Ehrlichia species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38:1331–1338.
- Simpson, C. F. 1974. Relationship of *Ehrlichia canis*-Infected Mononuclear Cells to Blood Vessels of Lungs. *Infect. Immunity.* 10(3): 590-596.
- Simpson, R. M., S. D. Gaunt, J. A. Hair, K. M. Kocan, W. G. Henk and H. W. Casey. 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.* 52:1537-1541.
- Smith, R. D., D. M. Sells, E. H. Stepheson, M. R. Ristic and D. L. Huxsoll. 1976. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia and its differentiation from a symbiotic rickettsia. *Am. J. Vet. Res.* 37:119-126.

- Solano-Gallego, L., J. Llull, M. Osso, B. Hegarty and E. Breitschwerdt. 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet. Res.* 37(2):231-244.
- Sonenshine, D. E., R. S. Lane and W. L. Nicholson. 2002. Ticks. p. 517-558. *In* G. Mullen and L. Durden. *Medical and veterinary entomology*. Academic Press, California.
- Songer, J.G. and K. W. Post. 2005. *Veterinary microbiology bacterial and fungal agents of animals disease*. Elsevier, USA.
- Stockham, S. L., D. A. Schmidt and J. W. Tyler. 1985. Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from central Missouri: a possible cause of polyarthritis. *Vet. Med. Review* 6:3-5.
- Stockham, S. L., D. A. Schmidt, K. S. Curtis, B. G. Schauf, J. W. Tyler and S. T. Simpson. 1992. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*. *Am. J. Vet. Res.* 53:63-67.
- Suksawat, J., C Pitulle, C. Arraga-Alvarado, K. Madrigal, S. I. Hancock and E. B. Breitschwerdt. 2001. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *J. Clin. Microbiol.* 39(1):90-93.
- Uhaa, I. J., J. D. MacLean, C. R. Green and D. B. Fishbein. 1992. A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: clinical and laboratory findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:161-164.
- Unver, A., A. Pérez, M. Orellana, H. Huang and Y. Rikihisa. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 39(8):2788-2793.
- Unver, A., Y. Rikihisa, M. Kawahara and S. Yamamoto. 2003. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. *Ann N Y Acad Sci* 990:692-698.
- Walker, D. H., N. Ismail, J. P. Olano, J. W. McBride, X-J. Yu and H-M. Feng. 2004. *Ehrlichia chaffeensis* : A prevalent, life-threatening, emerging pathogen. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* 115:375-383.
- Wall, R. and D. Shearer. 2001. *Veterinary ectoparasites: Biology, pathology and control*. 2nd. ed. Blackwell Science Ltd, USA.
- Wilson, J. F. 1992. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 28: 381-383.

- Wolf, L., T. McPherson, B. Harrison, B. Engber, A. Anderson and P. Whitt. 2000. Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina. J. Clin. Microbiol. 38(7):2795.
- Yabsley, M. J., A. S. Varela, C. M. Tate, V. G. Dugan, D. E. Stallknecht, S. E. Little and W. R. Davidson. 2002. *Ehrlichia ewingii* infection in White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Emerg. Infect. Dis. 8:668-671.

ARTÍCULO I

Detección de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma platys* en garrapatas colectadas de perros en Costa Rica

Resumen.

Se analizaron 165 garrapatas provenientes de 165 perros que asistieron a diferentes clínicas veterinarias de Costa Rica. La identificación de las garrapatas, según especie, determinó 160 *Rhipicephalus sanguineus*, 4 *Amblyomma ovale* y 1 *Ixodes boliviensis*. *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* fueron detectados por PCR en 43 (26.06%) y 5 (3.03%) garrapatas *R. sanguineus* respectivamente, siendo éste el primer reporte de la presencia de estos agentes infecciosos en garrapatas de Costa Rica. Dos garrapatas presentaron infecciones mixtas con *E. canis* y *A. platys*. Una muestra positiva para cada uno de estos agentes fue secuenciada, encontrando una similitud de 99% para *E. canis* y de 98% para *A. platys*. No se detectó la presencia de *E. chaffeensis* y *E. ewingii* en ninguna de las garrapatas analizadas. El análisis de regresión logística no reveló asociación con el sexo de la garrapata, la cantidad de garrapatas, la época de colecta, la raza y la edad del perro del cual se recolectaron las garrapatas con la presencia de *E. canis* y *A. platys*.

Palabras claves: *Anaplasmataceae*, *R. sanguineus*, *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, Costa Rica.

Abstract.

A total of 165 ticks were collected from 165 dogs attended in different veterinary clinics of Costa Rica. The identification of the species of ticks determined: 160 *Rhipicephalus sanguineus*, 4 *Amblyomma ovale* and 1 *Ixodes boliviensis*. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* were detected by PCR in 43 (26.6%) and 5 (3.03%) *R. sanguineus*, respectively, being this the first report of these infectious agents in ticks of Costa Rica. Two ticks presented mixed infection with *E. canis* and *A. platys*. A positive sample of *E. canis* and *A. platys* was sequenced determining a similarity of 99% and 98%, respectively. *E. chaffeensis* and *E. ewingii* were not detected in this study. A logistic regression analysis determined no association of gender and amount of ticks, time of collection of ticks, breed race and age of dogs and the presence of *E. canis* and *A. platys*.

Keywords: *Anaplasmataceae*, *R. sanguineus*, *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, Costa Rica.

1. Introducción

La familia *Anaplasmataceae* incluye agentes infecciosos transmitidos por garrapatas, que ocasionan enfermedades fatales en humanos, perros y otros animales domésticos, considerándose en la actualidad como un problema emergente (Dumler, 2005; Oteo y Brouqui; 2005, Sarih *et al.*, 2005).

Esta familia consiste de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella*, *Wolbachia* y ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ (Dumler *et al.*, 2001; Kawahara *et al.*, 2004). Todos los miembros de esta familia son bacterias pleomórficas, gram negativas, intracelulares obligadas, pertenecientes al subgrupo α -*Proteobacteria* y se replican dentro de una vacuola derivada de la membrana de la célula eucariota del hospedero, vertebrado o invertebrado (Rikihisa, 1991; Chen *et al.*, 1994; Dumler *et al.*, 2001; Harrus *et al.*, 2004; Songer y Post, 2005; Rar *et al.*, 2005; Naitou *et al.*, 2006).

Las garrapatas son los principales vectores en la transmisión de las bacterias intracelulares pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae*. En perros se ha demostrado la presencia de cinco especies miembros de esta familia (*Ehrlichia canis*, *E. ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* y *A. phagocytophilum*), de las cuales cuatro se han detectado afectando también a humanos (*E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *E. ewingii* y *E. canis*) (Sarih *et al.*, 2005; Rar *et al.*, 2005).

E. canis se ha detectado en *Rhipicephalus sanguineus* colectada de perros en Estados Unidos (Murphy *et al.*, 1998), Venezuela (Unver *et al.*, 2001) y Brasil (Aguiar *et al.*, 2007). *Amblyomma americanum* ha sido reportada como el principal vector de *E.*

chaffeensis (Anderson *et al.*, 1993; Ijdo *et al.*, 2000). También se ha encontrado en *Dermacentor variabilis* (McQuiston *et al.*, 1999), *Ixodes pacificus* (Kramer *et al.*, 1999), *I. ricinus* (Alekseev *et al.*, 2001), *I. ovatus* (Shibata *et al.*, 2000), *A. testudinarium*, *A. maculatum* (Kocan *et al.*, 2000), *Haemaphysalis yeni* y *H. longicornis* (Cao *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005). *E. ewingii* ha sido identificado en varias garrapatas colectadas de perros, incluyendo *R. sanguineus*, *A. americanum* y *D. variabilis* (Murphy *et al.*, 1998). De estas especies de garrapatas, solo *A. americanum* ha sido confirmada como vector de *E. ewingii* (Anziani *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2000). *A. platys* ha sido detectado en *R. sanguineus* en Japón (Inokuma *et al.*, 2000; Motoi *et al.*, 2001) y en *H. longicornis* y *I. persulcatus* en Korea (Kim *et al.*, 2006)

La ubicación de Costa Rica como país neotropical, brinda las condiciones ideales para el establecimiento y desarrollo de una gran variedad de garrapatas, siendo el perro uno de los animales afectados por estos ectoparásitos. *R. sanguineus* es la garrapata más común y la que se ha encontrado con mayor frecuencia infestando al perro en Costa Rica, también se han encontrado esporádicamente: *A. cajennense*, *A. maculatum*, *A. ovale*, *A. pecarium*, *I. boliviensis* y *Boophilus microplus* (Álvarez *et al.*, 2005). En *R. sanguineus* se han detectado mediante PCR *E. canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis* (Murphy *et al.*, 1998; Inokuma *et al.*, 2000; Ndip *et al.*, 2007).

En Costa Rica se han realizado únicamente dos trabajos en garrapatas, en uno se detectó *Rickettsia rickettsii* en garrapatas de conejos (*Haemaphysalis leporispalustris*) (Fuentes *et al.*, 1985) y en el otro, *Anaplasma marginale* en garrapatas de bovinos (*Boophilus microplus*) (Hermans *et al.*, 1994). Hasta la fecha no se han realizado estudios

de agentes patógenos en garrapatas de perros, que es frecuentemente el animal más cercano al hombre.

Dado el potencial zoonótico de estos agentes, se hace necesaria la detección de éstos en garrapatas de perros. Esto permitirá determinar las principales especies de garrapatas que podrían estar actuando como vectores de los miembros de esta familia.

El objetivo del presente estudio fue detectar, mediante la técnica de PCR, *Ehrlichia* spp. y *A. platys* en garrapatas de perros en Costa Rica. Asimismo analizar el efecto de las variables de las garrapatas, huésped, época y ubicación geográfica sobre la presencia de *Ehrlichia* spp. y *A. platys* en garrapatas.

2. Metodología

2.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional, con el fin de recolectar garrapatas de perros atendidos en clínicas veterinarias y detectar en estas garrapatas la presencia de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma platys*. La muestra fue seleccionada por conveniencia, de todos aquellos perros con garrapatas, atendidos en diferentes clínicas veterinarias del país, durante el periodo comprendido entre octubre del 2006 a julio del 2007.

2.2. Colecta e identificación de garrapatas

Se recolectaron las garrapatas observables en cada perro, las cuales se depositaron en un envase plástico con tapa, correspondiendo una muestra a cada perro, sin importar la cantidad de garrapatas recolectadas. Una ficha clínica con información del perro parasitado por las garrapatas se obtuvo en cada caso. Los datos tomados de cada perro por envase fueron: nombre del propietario, teléfono, dirección, edad del animal, raza, sexo, cantidad de

garrapatas presentes (en rango de pocas: 1-10, muchas: >10), tratamiento preventivo en el animal contra garrapatas (Anexo 1). Los envases fueron remitidos al Laboratorio de Entomología y Parasitología donde se preservaron en alcohol al 70% hasta su identificación y análisis. La identificación de las garrapatas se realizó con ayuda de un estereoscopio y mediante la utilización de claves para determinar las especies (Fairchild *et al.*, 1966; Jones *et al.*, 1972; Acha, 1979).

2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.3.1. Extracción de ADN

Para este estudio se utilizaron garrapatas completas en estadio adulto y ninfas. En el caso de garrapatas adultas se analizó una garrapata por perro, mientras que en el caso de ninfas se analizaron grupos de cinco. La extracción del ADN de las garrapatas se realizó utilizando el kit comercial “QIAamp DNA Blood Mini Kit de Qiagen” (Cat. No. 51104) siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial.

2.3.2. PCR para *Anaplasmataceae*

A las extracciones de ADN se les realizó un primer PCR usando un par de cebadores (EHR16SD y EHR16SR) (Cuadro 1), que amplifican un fragmento de 345 pb del gen 16S ARNr de varias especies de la familia *Anaplasmataceae* que incluyen: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *Neorickettsia sennetsu*, *N. risticii*, y *N. helminthoeca* (Inokuma *et al.*, 2000). Para esta amplificación la mezcla de reacción contenía 12.5 µl de Master Mix (Fermentas), 12.5 pmol de cada cebador, 7.5 µl de ADN, la reacción se completó con agua molecular (Fermentas) para un volumen final de 25 µl. Se utilizaron las siguientes condiciones: 5

min. de desnaturalización inicial a 95°C, 34 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 30 seg.), alineamiento (55°C por 30 seg.) y extensión (72°C por 90 seg.) y 5 min. de extensión final a 72°C. Como control positivo se utilizó un plásmido construido con una secuencia específica para *E. canis*, donado por el Dr. R. Ganta, de la Universidad de Kansas y agua como control negativo.

La electroforesis de los productos obtenidos en el PCR se realizó en geles de agarosa al 1.4% preparados en amortiguador TBE al 0.5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Las muestras que mostraron un tamaño de 345 pb se consideraron positivas.

2.3.3. PCR para *Ehrlichia* spp.

A todas las extracciones de ADN de garrapatas se les realizó además un PCR anidado. En el primer PCR se utilizaron los cebadores ECC y ECB (Cuadro 1), los cuales amplifican todas las especies de *Ehrlichia* (Kocan *et al.*, 2000). La mezcla de reacción contenía 12.5 µl de Master Mix (Fermentas), 5 µl ADN, 0.5 µM de cada cebador y ésta se llevó a un volumen final de 25 µl, utilizando agua grado molecular (Fermentas). Se utilizaron las siguientes condiciones: 4 min. de desnaturalización inicial a 94°C, 40 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 1 min.), alineamiento (65°C por 1 min.) y extensión (72°C por 1 min.) y una temperatura final de extensión de 72°C por 5 min. Como control positivo para *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* se utilizaron plásmidos ideados con secuencias específicas para cada uno de estos agentes donados por el Dr. R. Ganta, de la Universidad de Kansas y agua molecular como control negativo.

En el segundo PCR se utilizaron cebadores específicos por especie para detectar *E. chaffeensis*, *E. canis* y *E. ewingii*, utilizando como molde 1 µl del producto del PCR

anterior. Los cebadores se detallan en el Cuadro 1. El cebador HE3 es el reverso y fue utilizado para todas las especies de *Ehrlichia* en este estudio. La mezcla de reacción contenía 12.5 µl de Master Mix (Fermentas), 1 µl producto de la reacción anterior, 12.5 pmol de cada cebador y ésta se llevó a un volumen final de 25 µl, utilizando agua molecular. Se utilizaron las mismas condiciones de temperaturas descritas para el PCR del género *Ehrlichia*.

La electroforesis de los productos obtenidos en este PCR se realizó en geles de agarosa al 1.4% preparados en amortiguador TBE al 0.5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Las muestras que mostraron bandas con tamaño de 389 pb fueron consideradas como positivas a *E. canis*, aquellas que mostraron un tamaño de 390 pb fueron consideradas positivas a *E. chaffeensis* y las que mostraron un tamaño de 392 pb fueron consideradas como positivas a *E. ewingii*.

2.3.4. PCR para *Anaplasma platys*

Finalmente se realizó también otro PCR anidado, empleando en el primer paso los cebadores: 8F y 1448R (Cuadro 1) (Martin *et al.*, 2005), los cuales amplifican parte del gen 16S ARNr. El primer PCR consistió de 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min., alineamiento de 45°C por 1 min. y extensión de 72°C por 1 min. y 40 seg. La mezcla de reacción se preparó utilizando 5 µl de ADN, 12.5 pmol de cada cebador, 12.5 µl de Master Mix (Fermentas) y el resto se completó con agua molecular (Fermentas) para llegar a un volumen final de 25 µl. En el segundo PCR se utilizaron los cebadores: EHR16SR y PLATYS (Cuadro 1) (Martin *et al.*, 2005), cuyo producto esperado fue de 678 pb. La mezcla de reacción contenía 1 µl del producto anterior, 12.5 µl de Master Mix

(Fermentas), 12.5 pmol de cada cebador y el resto se completó con agua molecular (Fermentas) hasta llegar a un volumen final de 25 µl. Las condiciones para este PCR tuvieron una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 1 min., 40 ciclos de desnaturalización de 94°C por 30 seg., alineamiento de 55°C por 30 seg. y extensión de 72°C por 30 seg. con una extensión final de 72°C por 5 min. Como control positivo se utilizó ADN de una muestra de sangre de perro positiva a *A. platys*, mediante la observación de mórulas en plaquetas, la cual fue confirmada por secuenciación. Como control negativo se usó agua molecular (Fermentas).

Cuadro 1. Cebadores utilizados en los PCR realizados en el presente estudio

| Nombre | Secuencia | Especificidad | pb |
|----------------|---|-------------------------|-----------|
| EHR16SD | 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' | | |
| EHR16SR | 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3' | <i>Anaplasmataceae</i> | 345 |
| ECC | 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' | | |
| ECB | 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' | <i>Ehrlichia</i> spp. | 478 |
| HE3 | 5' TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' | | |
| ECAN5 | 5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' | <i>E. canis</i> | 389 |
| HE1 | 5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3' | <i>E. chaffeensis</i> | 390 |
| EE5 | 5'-CAATTCCTAAATAGTCTCTGACTATTTAG-3' | <i>E. ewingii</i> | 392 |
| 8F | 5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3' | <i>A. platys</i> y | |
| 1448R | 5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3' | Secuenciación <i>A.</i> | 678 |
| PLATYS | 5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3' | <i>platys</i> | |
| Dsb-330 | 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3' | Secuenciación | 409 |
| Dsb-728 | 5'-CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3' | <i>Ehrlichia</i> spp. | |

La electroforesis de los productos obtenidos en el segundo PCR se realizó en geles de agarosa al 1.4% preparado en amortiguador TBE al 0.5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Las muestras que mostraron banda con tamaño de 678 pb fueron consideradas positivas a *A. platys*.

2.4. Secuenciación

Para este fin se escogieron dos muestras de garrapatas, una muestra positiva a *E. canis* y otra a *A. platys*. A la muestra positiva a *E. canis*, se le realizó otro PCR utilizando los cebadores Dsb-330 y Dsb-728 (Cuadro1) siguiendo las condiciones descritas por Labruna *et al.*, 2007, este PCR amplifica un fragmento de 409 pb del gen *dsb* (gen formación de puentes de Thio-disulfuro oxireductasa). El producto de este PCR fue purificado usando columnas de purificación Centricon (Amicon), siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial y se le realizó una reacción de secuenciación que consistió en una temperatura de desnaturalización de 95°C de 2 min., 50 ciclos de desnaturalización de 95°C por 15 seg., alineamiento de 58°C por 30 seg. y extensión de 72°C por 30 seg., con una extensión final de 72°C por 5 min. Para la muestra positiva a *A. platys*, se procedió a purificar con columnas centricom el producto obtenido del PCR para *A. platys* y se realizó una reacción de secuenciación que consistió de una temperatura inicial de desnaturalización de 96°C por 1 min., 25 ciclos de desnaturalización de 96°C por 10 seg., alineamiento de 50°C por 5 seg. y extensión de 60°C por 4 min. La secuencia de los productos fueron determinados usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 y en el caso de *E. canis* el secuenciador “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Applied Biosystems” del “Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA) de la Universidad de Costa Rica (UCR)”; en el caso de *A. platys*, se utilizó el secuenciador “ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems” del “Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la UCR”.

La secuencia de *E. canis* fue analizada utilizando el programa BLAST, comparando la similitud de la secuencia parcial del gen *dsb* generada en este estudio con el genoma de

E. canis cepa Jake (NC_007354) almacenado en el GenBank. Para el caso del análisis de la secuencia de *A. platys* generada en este estudio, no se pudo utilizar el programa BLAST, debido a que aún no se ha secuenciado el genoma completo de este agente, por lo que se le realizó un alineamiento con el programa ClustalW2 comparándolo con la secuencia del plásmido del gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784) almacenado en el GenBank.

2.5. Análisis estadístico

2.5.1. Análisis descriptivo:

Se generaron tablas de frecuencia por categoría para cada una de las variables recolectadas en las fichas de datos de cada perro muestreado, las variables analizadas se muestran en el Cuadro 2. Las diferentes razas de los perros participantes se agruparon según el largo del pelo (Cuadro 3).

Cuadro 2. Variables y categorías analizadas en el análisis estadístico descriptivo

| VARIABLE | CATEGORÍA |
|---|--|
| Especie de garrapata | <i>R. sanguineus</i> - No <i>R. sanguineus</i> |
| Estadío de la garrapata | Adulta : Hembra y Macho Ninfa |
| Tiempo de recolecta de garrapatas | Estación seca (Dic 2006- Abr 2007) Estación lluviosa (Oct-Nov 2006 y de May-Jul 2007) |
| Raza del perro | Pelo largo Pelo medio Pelo corto |
| Edad del perro | Grupo 1 (0 - 12 meses) Grupo 2 (13 - 24 meses) Grupo 3 (> 24 meses) |
| Sexo del perro | Macho Hembra |
| Ubicación de Clínicas Veterinarias | Heredia Alajuela San José Cartago No Valle Central |
| Cantidad de garrapatas en perro | Pocas (1-10 garrapatas) Muchas (>10 garrapatas) |

Cuadro 3. Agrupación de las razas de perros participantes en el estudio según el largo del pelo.

| Razas de Pelo largo | Razas de Pelo medio | Razas de Pelo corto |
|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Akita | Criollo | Beagle |
| Chow Chow | Mixto | Boxer |
| Cocker Spaniel | Sin raza determinada | Bull Terrier |
| Collie | | Bulldog |
| Maltés | | Chihuahua |
| Pastor Ovejero Inglés | | Dachshund |
| Golden Retriever | | Dálmata |
| Husky | | Doberman |
| Pastor Alemán | | Gran Danés |
| Pequinés-Maltés | | Labrador Retriever |
| Poodle | | Pincher |
| Samoyedo | | Rottweiler |
| Shih-Tzu | | Shar-Pei |
| Yorkshire Terrier | | Stanford shire |
| Schnauzer | | Fox Terrier |
| | | Weimeraner |

2.5.2. Regresión logística:

Se realizó un modelo de regresión logística utilizando el procedimiento LOGISTIC implementado en el programa SAS (SAS® V.8.0, 1999), para las variables dependientes dicotómicas: ausencia-presencia *E. canis* y *A. platys*. Las variables independientes analizadas fueron: sexo de la garrapata, cantidad de garrapatas, época de colecta, raza y edad del perro. A la variable ubicación geográfica se le realizó un análisis univariado. Las variables que resultaron con valores de $p < 0.01$ fueron consideradas con un efecto altamente significativo sobre la presencia de los agentes estudiados; aquellos con valores de $p 0.01-0.05$ fueron considerados con efecto significativo y los que resultaron con valores $p > 0.05$ como no significativos.

3. Resultados

Se colectaron un total de 165 garrapatas de perros atendidos en clínicas veterinarias ubicadas en el Valle Central (157) y algunas residencias (8), de las cuales 79 provinieron de la provincia de Heredia, 53 de Alajuela, 21 de San José, 8 de Cartago y 2 de Guanacaste. Se analizaron 156 garrapatas adultas y 9 muestras de ninfas. De las garrapatas adultas analizadas 104 fueron hembras y 52 machos. Un total de 160 garrapatas fueron identificadas como *R. sanguineus*, 4 como *A. ovale* (provenientes de la provincia de Heredia) y 1 como *I. boliviensis* (provenientes de la provincia de Heredia).

Todas las garrapatas que resultaron positivas en algún PCR en el presente estudio fueron identificadas como *R. sanguineus*; en las otras especies de garrapatas no se detectó la presencia de *Ehrlichia* spp. o *A. platys*.

La presencia de agentes pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae* se detectó en 14 (8.48%) garrapatas, de las cuales 13 fueron garrapatas adultas y 1 ninfas. De las adultas que resultaron positivas, 7 eran hembras y 6 machos (Cuadro 4 y Figura 1).

E. canis se detectó en 43 (26.06%) garrapatas. De éstas 38 fueron adultas y 5 ninfas. De las garrapatas adultas que resultaron positivas a este agente 22 eran hembras y 16 fueron machos (Cuadro 4 y Fig. 1). El mayor número (22) de muestras que resultaron positivas a este agente provinieron de la provincia de Heredia (Cuadro 5). La presencia de *E. chafeensis* y *E. ewingii* no se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

A. platys fue detectada en 5 (3.03%) garrapatas analizadas. De éstas 4 eran adultas y 1 ninfas. De las garrapatas adultas que resultaron positivas a *A. platys*, 3 fueron

hembras y 1 macho (Cuadro 4). El mayor número (4) de muestra positivas a este agente provinieron de la provincia de Alajuela (Cuadro 5).

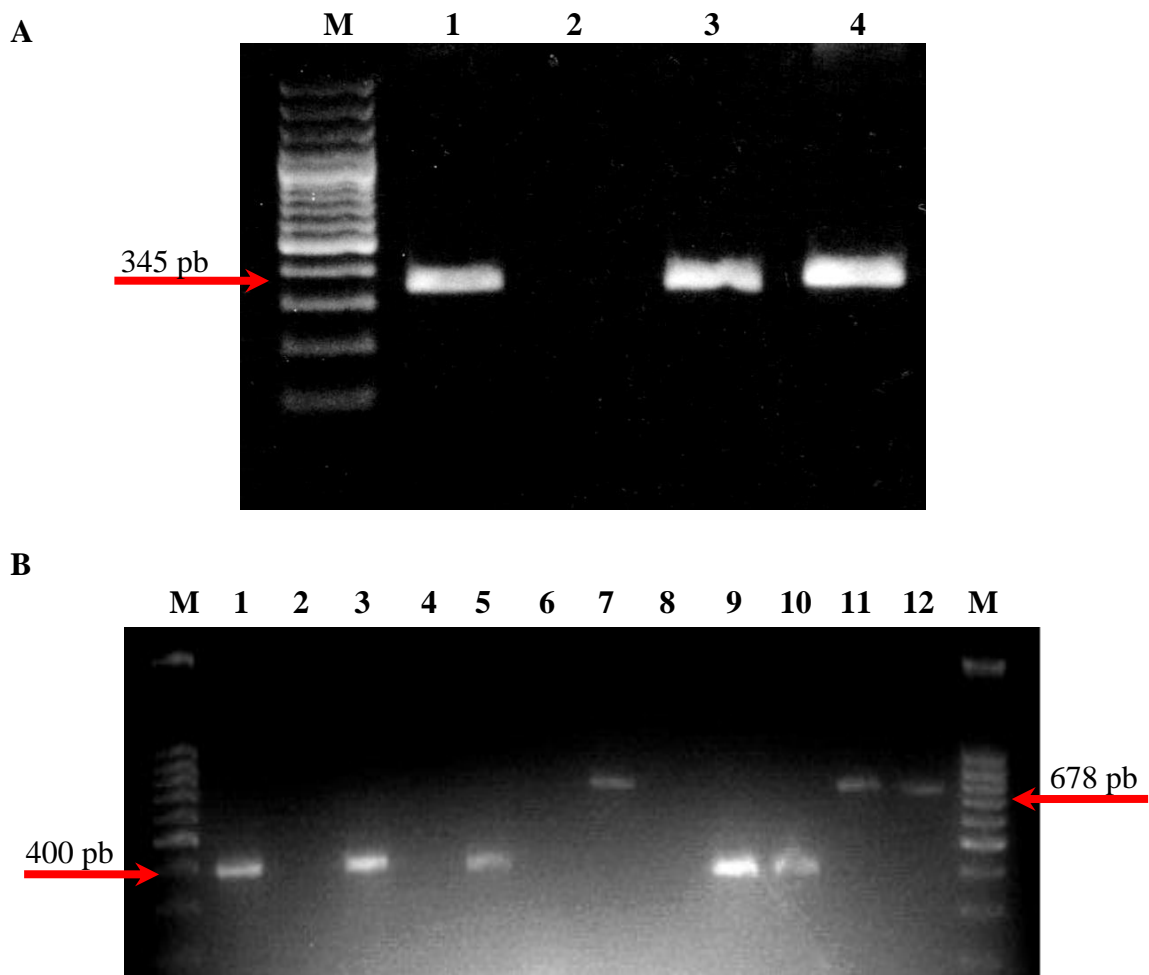


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR para *Anaplasmatataceae*, *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *A. platys*. (A) Electroforesis de gel de agarosa de los productos del PCR para *Anaplasmatataceae* (M: marcador de peso molecular; 1: control+; 2: control-; 3 y 4: muestras *R. sanguineus* positivas a *Anaplasmatataceae*. (B) Electroforesis de gel de agarosa de los productos del PCR para *Ehrlichia* spp. y *A. platys*. (M: marcador de peso molecular; controles+ *E. canis*; 3: *E. chaffeensis*; 5: *E. ewingii*; 7: *A. platys*; 2, 4, 6, 8: controles-; 9,10: *R. sanguineus* positivas a *E. canis* y 11,12: *R. sanguineus* positivas a *A. platys*.

Cuadro 4. Frecuencia y porcentaje de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas con *Anaplasmatataceae*, *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, según estadio y sexo de las garrapatas.

| Estadio y sexo | | Número (%) garrapatas infectadas con | | |
|----------------|--------|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| | | <i>Anaplasmatataceae</i> | <i>E. canis</i> | <i>A. platys</i> |
| Adulto | Hembra | 7 (4.24%) | 22 (13.33%) | 3 (1.82%) |
| | Macho | 6 (3.64%) | 16 (9.70%) | 1 (0.61%) |
| Ninfas | | 1 (0.61%) | 5 (3.03%) | 1 (0.61%) |
| TOTAL | | 14 (8.48%) | 43 (26.06%) | 5 (3.03%) |

Cuadro 5. Frecuencia y porcentaje de *Rhipicephalus sanguineus* positivas por provincia.

| Provincia | n | Número (%) de garrapatas infectadas con | | |
|------------------|------------|---|-----------------|------------------|
| | | <i>Anaplasmatataceae</i> | <i>E. canis</i> | <i>A. platys</i> |
| Heredia | 79 | 6 (7.59%) | 21 (26.58%) | 1(1.27) |
| Alajuela | 53 | 8 (15.09%) | 17 (32.08%) | 4 (7.55) |
| San José | 21 | 0 | 2 (9.52%) | 0 |
| Cartago | 8 | 0 | 2 (25%) | 0 |
| No valle central | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Sin ubicación | 2 | 0 | 1 (50%) | 0 |
| TOTAL | 165 | 14 | 43 | 5 |

Al comparar los resultados obtenidos en el PCR para *Anaplasmatataceae* con los resultados obtenidos en los PCR para *E. canis* y *A. platys*, se observa que 33 muestras positivas a *E. canis* y 3 positivas a *A. platys* no fueron detectadas por el PCR para *Anaplasmatataceae*. De las 14 muestras positivas en el PCR para *Anaplasmatataceae*, 10 resultaron positivas a *E. canis*, 2 positivas a *A. platys* y 2 negativas a ambos agentes y a *E. chaffeensis* y *E. ewingii* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados obtenidos en los PCR para *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* comparados con los resultados obtenidos en el PCR para familia *Anaplasmataceae*.

| Familia | <i>E. canis</i> | | | <i>A. platys</i> | | | |
|------------------------|-----------------|----|-------|------------------|---|-------|-----|
| | + | - | Total | + | - | Total | |
| Anaplasmataceae | + | 10 | 4 | 14 | 2 | 12 | 14 |
| | - | 33 | 118 | 151 | 3 | 148 | 151 |
| | Total | 43 | 122 | 165 | 5 | 160 | 165 |

Infecciones mixtas (*E. canis* y *A. platys*) se detectaron en dos de las 165 muestras analizadas: una garrapata adulto macho que provenía de Heredia y una muestra de ninfas que provenía de Alajuela.

Se logró secuenciar una muestra de *E. canis* obtenida de una garrapata, la cual mostró un 99% de identidad con la secuencia de *E. canis* cepa Jake (NC_007354) (Figura 2). La secuencia de una muestra de *A. platys* obtenida de una garrapata mostró un 98% de identidad con el gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784) (Figura 3).

Durante la época seca se recolectaron 114 garrapatas y durante la época lluviosa 51. El número de muestras positivas a *E. canis* y *A. platys* resultó ser mayor en la época seca con 28 (24.56%) y 4 (3.51%), respectivamente, que en la época lluviosa con 15(29.41%) y 1(1.96%), respectivamente.

El número de muestras positivas para *E. canis* y *A. platys*, en base a las características de los perros de los cuáles se recolectaron las garrapatas se muestra en el Cuadro 7.

```

Query 1      GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT 60
            |
Sbjct 997220 GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT 997279
            |
Query 61     TATGCAGCACTACATTACAAGCAACAGTTTAAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA 120
            |
Sbjct 997280 TATGCAGCACTACATTACAAGCAACAGTTTAAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA 997339
            |
Query 121    TCAATAGGTATAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA 180
            |
Sbjct 997340 TCAATAGGTATAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA 997399
            |
Query 181    GACAAAATGATACAATCTACCAGAGAAGCTAGCACAGAACATTAATATATGGGGCACTCCT 240
            |
Sbjct 997400 GACAAAATGATACAATCTACCAGAGAAGCTAGCACAGAACATTAATATAAGGGCACTCCT 997459
            |
Query 241    GCTATCATAGTAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCA 288
            |
Sbjct 997460 GCTATCATAGTAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCA 997507

```

Figura 2. Comparación de la secuencia de *E. canis* obtenida de *R. sanguineus* de Costa Rica (Query) con el genoma de *E. canis* obtenido de un perro de EEUU (Sbjct).

Previo al análisis de regresión logística se realizaron algunas exclusiones y reagrupaciones de categorías, debido a que presentaron frecuencias reducidas. Las especies de garrapatas *A. ovale* e *I. boliviensis* fueron excluidas del modelo de regresión, debido a que sólo 5 muestras de garrapatas estaban ubicadas dentro de estas especies, todas las demás fueron *R. sanguineus*. También se excluyó el estadio ninfal, y la variable ubicación geográfica. La época de colecta se analizó mediante el modelo de regresión para *E. canis* pero no para *A. platys*.


```

A._platys_16S_A      TTTGTCGTAGCTTGCTATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATG 100
A.platys_garrap     -----TG 2
                                                              **

A._platys_16S_A      CATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAA 150
A.platys_garrap     CATAGGA-TCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAA 51
*****

A._platys_16S_A      TACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTA 200
A.platys_garrap     AA--GGAAAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTA 99
* * * *****

A._platys_16S_A      TGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTA 250
A.platys_garrap     TGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTA 149
*****

A._platys_16S_A      TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGATACGGTCCA 300
A.platys_garrap     TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGATACGGTCCA 199
*****

A._platys_16S_A      GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC 350
A.platys_garrap     GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC 249
*****

A._platys_16S_A      TGATCCAGCTATGCCCGGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTC 400
A.platys_garrap     TGATCCAGCTATGCCCGGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTC 299
*****

A._platys_16S_A      TTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAAC 450
A.platys_garrap     TTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAAC 349
*****

A._platys_16S_A      TCCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAA 500
A.platys_garrap     TCC-GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAA 398
*** *****

A._platys_16S_A      TTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGTAAGTTAAAGGTGAAAT 550
A.platys_garrap     TTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGTAAGTTAAAGGTGTAAT 448
*****

A._platys_16S_A      GCCAGGGCTTAAACCTGGAGCTGCTTTTAACTGCCAGACTCGAGTCCG 600
A.platys_garrap     GCCAGGGCTTAAACCTGGAGCTGCTTTTAACTGCCAGACTCGAGTCCG 498
*****

A._platys_16S_A      GGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAG 650
A.platys_garrap     GGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGAT-TTAG 547
*****

A._platys_16S_A      GAGGAACACCAGTGGCGAA-GGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGA 699
A.platys_garrap     GAGGAACACCAGTGGCGAAAGGTGGCTATCTGGTCCGGTACTGAC----- 592
***** ** *****

```

Figura 3. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región 16S ARNr de la muestra de *A. platys* obtenida de *R. sanguineus* de Costa Rica (*A.platys_garrap*) y la secuencia de este gen de *A. platys* depositado en el GenBank (*A._platys_16S_A*).

Cuadro 7. Frecuencia de garrapatas positivas a *E. canis* y *A. platys* en base a las características de los perros de los cuales se colectaron las garrapatas.

| Variable | Categoría | n | Número (%) garrapatas infectadas | |
|---|-------------------------|-----|----------------------------------|------------------|
| | | | <i>E. canis</i> | <i>A. platys</i> |
| Raza del perro | Pelo largo | 82 | 16 (19.51%) | 1 (1.21%) |
| | Pelo medio | 25 | 8 (32.00%) | 1 (4.00%) |
| | Pelo corto | 45 | 16 (35.55%) | 3 (6.67%) |
| | Sin datos | 13 | 3 (23.08%) | 0 (0%) |
| Edad del perro | 1 (0 - 12 meses) | 41 | 19 (46.34%) | 3 (7.32%) |
| | 2 (13 - 24 meses) | 28 | 17 (60.71%) | 0 (0%) |
| | 3 (> 24 meses) | 66 | 2 (3.03%) | 2 (3.03%) |
| | Sin datos | 30 | 7 (23.33%) | 0 (0%) |
| Sexo del perro | Macho | 78 | 21 (26.92%) | 3 (3.85%) |
| | Hembra | 81 | 21 (25.93%) | 2 (2.47%) |
| | Sin datos | 6 | 1 (16.67%) | 0 (0%) |
| Cantidad de garrapatas infestando al perro | Pocas (1-10 garrapatas) | 112 | 31 (27.68%) | 3 (2.68%) |
| | Muchas (>10 garrapatas) | 53 | 12 (22.64%) | 2 (3.77%) |
| | Sin datos | 0 | 0 (0%) | 0 (0%) |

El modelo de regresión logística determinó que ninguna de las variables analizadas ejerció efecto significativo sobre la incidencia de *E. canis* y *A. platys* en las garrapatas analizadas (Cuadro 8 y 9). La variable de ubicación geográfica tampoco mostró efecto significativo sobre la incidencia de *E. canis* y *A. platys* en garrapatas en el análisis univariado.

Cuadro 8. Análisis de regresión logística del efecto de las variables independientes estudiadas sobre la presencia de *E. canis* en garrapatas.

| Efecto | Pr>Chi ² | Clase | OR | IC 95% |
|-------------------------------|---------------------|----------|-------|--------------|
| Sexo de la garrapata | 0.3004 | Macho | 1 | - |
| | | Hembra | 0.619 | 0.25-1.534 |
| Raza del perro | 0.1216 | Medio | 1 | - |
| | | Corto | 0.383 | 0.101-1.449 |
| | | Largo | 0.283 | 0.085- 0.945 |
| Cantidad de garrapatas | 0.1221 | Pocas | 1 | - |
| | | Muchas | 0.442 | 0.157-1.245 |
| Edad del perro | 0.4543 | Grupo 3 | 1 | - |
| | | Grupo 1 | 1.757 | 0.661-4.672 |
| | | Grupo 2 | 0.923 | 0.278-3.064 |
| Sexo del perro | 0.3611 | Macho | 1 | - |
| | | Hembra | 1.492 | 0.632-3.523 |
| Época de colecta | 0.5504 | Seca | 1 | - |
| | | Lluviosa | 0.749 | 0.289-1.936 |

IC95%: intervalo de confianza; OR: odds ratios; Pr: probabilidad.

Cuadro 9. Análisis de regresión logística del efecto de las variables independientes estudiadas sobre la presencia de *A. platys* en garrapatas.

| Efecto | Pr>Chi ² | Clases | OR | IC 95% |
|-------------------------------|---------------------|---------|-------|--------------|
| Sexo de la garrapata | 0.7426 | Macho | 1 | - |
| | | Hembra | 1.52 | 0.125-18.489 |
| Raza del perro | 0.5591 | Medio | 1 | - |
| | | Corto | 2.098 | 0.139-31.606 |
| | | Largo | 0.5 | 0.025-9.901 |
| Cantidad de garrapatas | 0.1109 | Pocas | 1 | - |
| | | Muchas | 7.065 | 0.638-78.174 |
| Edad del perro | 0.9194 | Grupo 3 | 1 | - |
| | | Grupo 1 | 0.57 | 0.039-8.393 |
| | | Grupo 2 | 0.836 | 0.061-11.394 |
| Sexo del perro | 0.696 | Macho | 1 | - |
| | | Hembra | 0.644 | 0.071-5.859 |

IC95%: intervalo de confianza; OR: odds ratios; Pr: probabilidad.

4. Discusión

El presente estudio reporta por primera vez la detección de *E. canis* y *A. platys* en garrapatas *R. sanguineus* colectadas de perros en Costa Rica. Aunque ya existían trabajos en Costa Rica, en los que se reportaba una alta seroprevalencia de *E. canis* en perros (Rímolo, 2006), no se habían realizado estudios de este agente en garrapatas. Este estudio confirma lo reportado por Groves *et al.* (1975), que *E. canis* es transmitida principalmente por la garrapata *R. sanguineus* y esta en concordancia con estudios realizados en los Estados Unidos, Venezuela, Brazil y Camerún (Murphy *et al.*, 1998; Unver *et al.*, 2001; Aguiar *et al.*, 2007; Ndip *et al.*, 2007), que reportan la presencia de *E. canis* en *R. sanguineus*. Los estudios que se han realizado para detectar *A. platys* en *R. sanguineus* son escasos. La literatura reporta únicamente dos trabajos realizados en Japón por Inokuma *et al.* en el 2000 y Motoi *et al.* en el 2001, en los que se detectó este agente en *R. sanguineus* de perros. Sin embargo, el papel de esta garrapatas como vector biológico no ha sido confirmado aún (Harvey *et al.*, 1978; Simpson *et al.*, 1991). Por consiguiente, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran evidencia adicional. En el presente estudio no se logró detectar la presencia de *E. chaffensis* y *E. ewingii* en las garrapatas colectadas, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estos agentes estén presentes en Costa Rica, ya que trabajos realizados en Estados Unidos y Camerún reportan la presencia de éstos en *R. sanguineus* (Murphy *et al.*, 1998; Ndip *et al.*, 2007).

Al comparar el número de muestras que resultaron positivas mediante el PCR para *Anaplasmataceae*, que permite detectar varias especies de esta familia (Parola *et al.*, 1998), con los resultados de los PCR anidados utilizados en este estudio para detectar *E. canis* y

A. platys, se demostró una baja sensibilidad del primero, ya que sólo fueron detectadas 10 de 43 muestras positivas a *E. canis* y 2 de 5 muestras positivas a *A. platys*. Estos resultados concuerdan con Martín *et al.* (2005), que reportan una alta sensibilidad del PCR para *A. platys* en contraste con el PCR para *Anaplasmataceae* y también con Wen *et al.* (1997), sobre la alta sensibilidad del PCR para *Ehrlichia* spp. Las 2 muestras que resultaron positivas en el PCR para *Anaplasmataceae* y en las cuales no se pudo demostrar la presencia de *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *A. platys* podrían estar infectadas con otras especies de esta familia, por ejemplo *A. phagocytophilum* u otro agente relacionado al género *Ehrlichia* (Shibata *et al.*, 2000; Shpynov *et al.*, 2004; Rar *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en la secuenciación en donde la muestra de *E. canis* y *A. platys* mostraron alta similitud con las secuencias de referencias depositadas en el GenBank confirman lo reportado en la literatura, que el gen *dsb* es conservado dentro de la especie de *E. canis* (Aguiar *et al.*, en prensa) y el gen 16S ARN es conservado para *A. platys* (Dumler *et al.*, 2001).

El hecho, de que no se encontrara asociación con el modelo de regresión logística para ninguna de las variables estudiadas sobre la incidencia de *E. canis* y *A. platys*, se debió probablemente, a que el tamaño de la muestra fue insuficiente, además de la falta de datos en la mayoría de las muestras.

5. Conclusiones

- Se detectó por primera vez la presencia de *E. canis* y *A. platys* en *R. sanguineus* de perros en Costa Rica.

- Infecciones mixtas con *E. canis* y *A. platys* se detectaron por primera vez en *R. sanguineus* de perros de Costa Rica.
- El análisis de secuenciación demostró un 99% y 98% de identidad de *E. canis* y *A. platys* respectivamente en *R. sanguineus* de Costa Rica con secuencias almacenadas en el GenBank para cada uno de estos agentes.
- Se confirmó la baja sensibilidad del PCR para *Anaplasmataceae* y la alta sensibilidad de los PCR anidados para la detección de *E. canis* y *A. platys*.
- No se pudo detectar la presencia de *E. ewingii* y *E. chaffeensis* en las garrapatas analizadas en el presente estudio, sin embargo los resultados indican la presencia de otras especies de la familia *Anaplasmataceae* presentes en garrapatas de Costa Rica.
- Ninguna de las variables analizadas mostró efecto significativo sobre la incidencia de *E. canis* y *A. platys* en garrapatas.

6. Recomendaciones

- Continuar los estudios en garrapatas con un tamaño de muestra representativo para detectar o descartar la presencia de *E. ewingii* y *E. chaffeensis* y otras especies de la familia *Anaplasmataceae* en Costa Rica.
- Realizar infecciones experimentales en *R. sanguineus* con *A. platys* para determinar el papel de esta garrapata como vector de este agente.

7. Referencias Bibliográficas

- Acha, P. 1979. Garrapatas. CENAPA. SARH, México.
- Aguiar, D. M., M. K. Hagiwara and M. B. Labruna. Molecular characterization of an *Ehrlichia canis* isolate from Sao Paulo, Brazil. Short Communication. Braz J Microbiol. (en prensa).
- Aguiar, D. M., G. T. Cavalcante, A. Pinter, S. M. Gennari, L. M. Camargo and M. B. Labruna. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. J. Med. Entomol. 44(1):126-132.
- Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, A. V. Semenov and C. V. Bolshakov. 2001. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. J. Med. Entomol. 38:471–474.
- Álvarez, V., Hernández V, Hernández J. 2005. Catálogo de garrapatas suaves (Acari: Argasidae) y duras (Acari: Ixodidae) de Costa Rica. BRENESIA, 63(64):81-88.
- Anderson, B. E., K. G. Sims, J. G. Olson, J. E. Childs, J. F. Piesman, C. M. Happ, G. O. Maupin and B. J. Johnson. 1993. *Amblyomma americanum* : A potential vector of human ehrlichiosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49:239–244.
- Anziani, O. S., S. A. Ewing, and R. W. Barker. 1990. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. Am. J. Vet. Res. 51:929–931.
- Cao, W. C., Y. M. Gao, P. H. Zhang, X. T. Zhang, Q. H. Dai, J. S. Dumler, L. Q. Fang and H. Yang. 2000. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from southern China. J. Clin. Microbiol. 38:2778–2780.
- Chen, S-M., J. S. Dumler, J. S. Bakken and D. H. Walker. 1994. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. 32(3):589-595.
- Dumler, J. S. 2005. *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063:361-373.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales : Unification of some species of Ehrlichia and Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:2145-2165.

- Fairchild, G., G. Kohls and V. Tipton. 1966. The ticks of Panama (Acarina: Ixodoidea). p. 425-444. *In*: R. Wenzel and V. Tipton (eds.). Ectoparasites of Panama. Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois.
- Fuentes, L., A. Calderón and L. Hung. 1985. Isolation and identification of *Rickettsia rickettsii* from the rabbit ticks (*Haemaphysalis leporispalustris*) in the Atlantic zone of Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34(3):564-567
- Groves, M. G., G. L. Dennis, H. L. Amyx, and D. L. Huxsoll. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36:937-940.
- Harrus, S., T. Waner, S. Mahan and H. Bark. 2004. Rickettsiales. p. 425-444. *In* Gyles, C. L., J. F. Prescott, J. G. Songer and C.O. Thoen. Pathogenesis of bacterial infection in animals. Blackwell Publishing, USA.
- Hermans, P., R. H. Dwinger, G. M. Buening and M. V. Herrero. 1994. Seasonal incidence and haemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. *Biol. Trop.* 42(3):623-632.
- Ijdo, J. W., C. Wu, L.A. Magnarelli, K. C. Stafford III, J. F. Anderson and E. Fikrig. 2000. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* DNA in *Amblyomma americanum* ticks in Connecticut and Rhode Island. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4655-4656.
- Inokuma, H., D. Raoult and P. Brouqui. 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown Dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38(11):4219-4221.
- Jones, E., C. Clifford, J. Keirans and G. Kohls. 1972. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Sci. Bull. Brigham Young University.* 17:20-26.
- Kawahara, M., Y. Rikihisa, E. Isogai, M. Takahashi, H. Misumi, C. Suto, S. Shibata, C. Zhang and M. Tsuji. 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1837-1843.
- Kim, C-M., Y-H. Yi, D-H. Yu, M-J. Lee, M-R. Cho, A. R. Desai, S. Shringi, T. A. Klein, H-C. Kim, J-W Song, L-J. Baek, S-T. Chong, M. L. O'Guinn, J. S. Lee, I-Y. Lee, J-H. Park, J. Foley and J-S Chae. 2006. Tick-borne pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 5766-5776.
- Kocan, A., G. Crowder, L. C. Whitworth, G. L. Murphy, S. A. Ewing and R. W. Barker. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* 6(5):477-480.

- Kramer, V. L., M. P. Randolph, L. T. Hui, W. E. Irwin, A. G. Gutierrez and D. J. Vugia. 1999. Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:62–65.
- Labruna, M. B., J. W. McBride, L. M. A. Camargo, D. M. Aguiar, M. J. Yabsley, W. R. Davidson, E. Y. Stromdahl, P. C. Williamson, R. W. Stich, S. Wesley, E. P. Camargo and D. H. Walker. 2007. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet. Parasitol.* 143:189-195.
- Lee, S. O., D. K. Na, C. M. Kim, Y. H. Li, Y. H. Cho, J. H. Park, J. H. Lee, S. K. Eo, T. A. Klein and J. S. Chae. 2005. Identification and prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* infection in *Haemaphysalis longicornis* ticks from Korea by PCR, sequencing and phylogenetic analysis based on rRNA gene. *J. Vet. Sci.* 6(2):151-155.
- Martin, A. R., G. K. Brown, R. H. Dunstan and T. K. Roberts. 2005. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp. Parasitol.* 109(3):176-180.
- McQuiston, J. H., C. D. Paddock, R. C. Holman, and J. E. Childs. 1999. The human ehrlichioses in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:635–642.
- Motoi, Y, H. Satoh, H. Inokuma, T. Kiyuuna, Y. Muramatsu, H. Ueno and C. Morita. 2001. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol.* 45(1):89-91.
- Murphy, G. I., S. A. Ewing, L. C. Whitworth, J. C. Fox and A. A. Kocan. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79:325–339.
- Naitou, H., D. Kawaguchi, Y. Nishimura, M. Inayoshi, F. Kawamori, T. Masuzawa, M. Hiroi, H. Kurashige, H. Kawabata, H. Fujita and N. Ohashi. 2006. Molecular identification of *Ehrlichia* species and ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol. Immunol.* 50(1):45-51.
- Ndip, L. M., R. N. Ndip, V. E. Ndivi, J. A. Awuh, D. H. Walker and J. W. McBride. 2007. *Ehrlichia* species in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Cameroon. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 7(2):1-7.
- Oteo, J. A. and Brouqui P. 2005. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23(69):375-380.
- Parola, P., L. Beati, M. Cambon, P. Brouqui and D. Raoult. 1998. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* ticks in France. *J. Med. Entomol.* 35: 180-183.
- Rar, V. A., N. V. Fomenko, A. K. Dobrotvorsky, N. N. Livanova, S. A. Rudakova, E. G. Fedorov, V.B. Astanin and O. V. Morozova. 2005. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Rusia. *Emerg. Infect. Dis.* 11(11):1708-1715.

- Rikihisa, Y. 1991. The tribe *Ehrlichiae* and Ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev. 4(3):286-308.
- Rímolo, M. 2006. Prevalencia serológica y citológica de la ehrlichiosis canina en Costa Rica (Tesis). Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional, 32p
- Sarih, M'H., Y. M'Ghirbi, A. Bouattour, L. Gern, G. Baranton and D. Posti. 2005. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. J. Clin. Microbiol. 43(3):1127-1132.
- Shibata, S., M. Kawahara, Y. Rikihisa, H. Fujita, Y. Watanabe, C. Suto, and T. Ito. 2000. New Ehrlichia species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. J. Clin. Microbiol. 38:1331–1338.
- Shpynov, S., P. E. Fournier, N. Rudakov, M. Tankibaev, I. Tarasevich and D. Raoult. 2004. Detection of a *Rickettsia* closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*," *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. J. Clin. Microbiol. 42:2221–2223.
- Songer, J.G. and K. W. Post. 2005. Veterinary microbiology bacterial and fungal agents of animals disease. Elsevier, USA.
- Unver, A., A. Pérez, M. Orellana, H. Huang and Y. Rikihisa. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. J. Clin. Microbiol. 39(8):2788-2793.
- Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, Couto GC, Unver A, Bartsch R. 1997. Comparison of nested PCR with Immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. J Clin Microbiol 35:1852-1855.
- Wolf, L., T. McPherson, B. Harrison, B. Engber, A. Anderson and P. Whitt. 2000. Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina. J. Clin. Microbiol. 38(7):2795.

ARTÍCULO II

DetECCIÓN MOLECULAR DE *Anaplasma platys* EN PERROS DE COSTA RICA

Resumen.

Se analizaron 300 muestras sanguíneas provenientes de perros sospechosos de ehrlichiosis o trombocitopenia infecciosa cíclica atendidos en clínicas veterinarias mediante PCR. Un total de 19 (6.33%) muestras resultaron positivas a *A. platys*. Este hallazgo representa el primer reporte de la detección de *A. platys* en caninos en diferentes áreas geográficas (San José, Heredia, Alajuela, Cartago y Guanacaste) de Costa Rica. En 7 muestras caninas se encontró además infección mixta (*A. platys* y *E. canis*). Una muestra positiva a *A. platys* fue secuenciada mostrando una similitud del 100%. No se determinó efecto significativo de las variables cualitativas (raza, sexo y edad del perro, ubicación de la clínica veterinaria y época de colecta de la muestra) y cuantitativas (hematocrito, hemoglobina, leucocitos, linfocitos y número de segmentados) sobre la presencia de *A. platys*.

Palabras claves: *Anaplasma platys*, TICC, perros, Costa Rica.

Abstract

A total of 300 blood samples collected from dogs, suspicious of suffering ehrlichiosis or canine cyclic thrombocytopenia (ICCT) attended in veterinary clinics were analyzed using PCR to detect *A. platys*. A total of 19 (6.33%) samples yielded positive results, representing the first report of the presence of *A. platys* infecting dogs in different geographical areas (San Jose, Heredia, Alajuela, Cartago and Guanacaste) from Costa Rica. In a total of 7 canine samples mixed infections (*A. platys* and *E. canis*) were determined. A positive sample of *A. platys* was sequenced, determining a similarity of 100%. Qualitative variables (breed race, gender, age of the dog, geographical location of the veterinary clinic and time of collection of the samples) and quantitative variables (haematocrit, hemoglobin, leukocytes, lymphocytes and segmented) showed no significant effect on the presence of *A. platys*.

Keywords: *Anaplama platys*, ICCT, dogs, Costa Rica.

1. Introducción

Anaplasma platys, anteriormente reconocida como miembro del género *Ehrlichia* (*Ehrlichia platys*), pasó a formar parte del género *Anaplasma* en el 2001 (Dumler *et al.*, 2001). Fue descrita por primera vez en 1978 en Estados Unidos, como el agente causal de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina (TICC), y se sospecha que es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, sin embargo, el papel de esta garrapata como vector biológico no ha sido confirmado aún (Harvey *et al.*, 1978; Simpson *et al.*, 1991). Este agente rickettsial es intracelular obligado, afecta las plaquetas. En estas se encuentra individualmente, en pares o grupos dentro de vacuolas, llamadas mórulas (French and Harvey, 1983). *A. platys* ha sido diagnosticado mediante técnicas serológicas y moleculares en perros de Grecia (Kontos *et al.*, 1991), China (Chang y Pan, 1996), Japón (Inokuma *et al.*, 2001; Motoi *et al.*, 2001; Inokuma *et al.*, 2002; Unver *et al.*, 2003), Tailandia (Suksawat *et al.*, 2001), Australia (Brown *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005), España (Sainz *et al.*, 1999; Aguirre *et al.*, 2006), Francia (Beaufils *et al.*, 2002), Italia (de la Fuente *et al.*, 2006) y Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005).

La infección aguda por *A. platys* se caracteriza por una parasitemia de plaquetas, seguido por episodios de trombocitopenia, que ocurren en intervalos de 7 a 14 días (Harvey *et al.*, 1978; French and Harvey, 1983). La mayoría de los reportes indican que los perros infectados con este agente, generalmente no son afectados clínicamente y rara vez muestran signos significantes de hemorragia. Sin embargo, existen trabajos en los que se ha reportado anorexia, letargia, depresión, pérdida de peso, descarga nasal mucopurulenta, mucosas pálidas, fiebre, presencia de garrapatas, linfadenomegalia, hiperplasia linfoide,

proliferación de macrófagos en nódulos linfáticos, hígado y bazo, leve hemorragia o edema en múltiples órganos, incluyendo hemorragia intrafolicular del bazo y características hematológicas anormales, diferentes a trombocitopenia como: presencia de plaquetas gigantes, hematocritos bajos, monocitosis y baja concentración de albúmina (Baker *et al.*, 1987; Harrus *et al.*, 1997). El estado crónico de la enfermedad se asocia con parasitemias esporádicas y trombocitopenias cíclicas (Chang y Pan, 1996; Harvey *et al.*, 1978).

Los signos clínicos asociados con TICC no son específicos, por consiguiente, se dificulta su diagnóstico. Actualmente, el diagnóstico se basa en la demostración de inclusiones basofílicas mediante tinción de Giemsa en plaquetas a partir de un frotis sanguíneo o la detección de anticuerpos mediante técnicas de inmunofluorescencia. La detección de la mórula en plaquetas consume mucho tiempo y usualmente no es satisfactoria, especialmente en casos crónicos por la aparición cíclica de los parásitos en las plaquetas (French y Harvey, 1983). La inmunofluorescencia parece ser relativamente específica para identificar perros que han sido expuestos a *A. platys*, ya que son mínimas las reacciones cruzadas que se reportan entre *A. platys*, sin embargo, la inmunofluorescencia tiene como desventaja que reconoce tanto un animal con la enfermedad activa como un animal recuperado, ya que éstos últimos pueden permanecer seropositivos por mucho tiempo (Chang y Pan, 1996; Mathew *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada mundialmente para caracterizar agentes patógenos y como herramienta en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *A. platys* ha sido detectado mediante PCR en estudios realizados en Estados Unidos (Wilson, 1992; Mathew *et al.*, 1997), Taiwán (Chang y pan, 1996), Japón (Motoi *et*

al., 2001), Australia (Brown *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006), Francia (Beaufils *et al.*, 2002), Venezuela (Huang *et al.*, 2005), Italia (de la Fuente *et al.*, 2006), Tailandia (Pinyoowong *et al.*, 2007) y Bélgica (Heyman *et al.*, 2007). El objetivo del presente trabajo fue detectar mediante una técnica molecular la presencia de *A. platys* en muestras de sangre de perros de Costa Rica.

2. Metodología

2.1. Tipo de estudio y tamaño de muestra

El presente trabajo se trató de un estudio observacional, con el fin de detectar *A. platys* en muestras de sangre de perros con sintomatología sospechosa a ehrlichiosis y a TICC, atendidos en clínicas veterinarias del Valle Central y Guanacaste de Costa Rica.

Un total de 276 muestras de sangre se obtuvieron de un banco de sangre colectado previamente para un estudio de detección molecular de *Ehrlichia* spp. y provenían de casos de perros con sintomatología sospechosa de ehrlichiosis, muestras positivas en el frotis sanguíneo (observación de inclusiones leucocitarias) o muestras con serología positiva a *E. canis* (Snap® 3DX) y 24 muestras de casos clínicos provenientes del laboratorio de análisis clínico de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, sospechosos de sufrir TICC, con recuento plaquetario por debajo de 150,000 pks/ μ l. Estas muestras fueron guardadas a -70 °C. Cada muestra contaba con información relevante del perro del cual se obtuvo la muestra como: ubicación de la clínica veterinaria de donde provenía la muestra, raza, edad, sexo del perro, signos clínicos y resultado del hemograma completo.

El tamaño de muestra utilizado para este estudio fue de 300 muestras, calculado mediante el uso del programa Win Episcopo 2.0, utilizando una prevalencia de 1% y un

nivel de confianza del 95%. De estas 300 muestras de sangre, 212 fueron analizadas simultáneamente mediante PCR para la detección de *Ehrlichia* spp., resultando 92 positivas a *E. canis* en un estudio previo (Romero, 2008)

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.2.1. Extracción de ADN

Se empleó el kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de Promega, siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes para extraer ADN de las muestras de sangre en perros. Los productos obtenidos de estas extracciones se guardaron a -20°C hasta su análisis mediante PCR.

2.2.2. PCR para *Anaplasmataceae*

Las extracciones de ADN se sometieron a un PCR utilizando los cebadores EHR16D y EHR16R (Cuadro 1), que amplifican un fragmento de 345 pb del gen *16S ARNr* (16S ARN ribosomal) de varias especies de la familia *Anaplasmataceae* incluyendo: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *Neorickettsia sennetsu*, *N. risticii*, y *N. helminthoeca* (Inokuma *et al.*, 2000). La mezcla de reacción contenía 12.5 µl de Master Mix (Fermentas), 12.5 pmol de cada cebador, 7.5 µl de ADN, la reacción se completó con agua grado molecular (Fermentas) para un volumen final de 25 µl. Se utilizaron las siguientes condiciones: 5 min. de desnaturalización inicial a 95°C, 34 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 30 seg.), alineamiento (55°C por 30 seg.) y extensión (72°C por 90 seg.) y 5 min. de extensión final a 72°C. Como control positivo se utilizó un plásmido construido con la

secuencia del gen 16S ARNr de *E. canis*, donado por el Dr. Ganta de la Universidad de Kansas. Y agua como control negativo.

La electroforesis de los productos obtenidos en el PCR se realizó en geles de agarosa al 1.4% preparados en amortiguador TBE (0.5%), teñidos con bromuro de etidio y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Muestras que mostraron un tamaño de 345 pb se consideraron como positivas a *Anaplasmataceae*.

2.2.3. PCR para *Anaplasma platys*

Las extracciones de ADN se sometieron además a un PCR anidado, empleando los cebadores 8F y 1448R (Cuadro 1), que amplifican parte del gen 16S ARNr. Este primer PCR consistió de 40 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 1 min.), alineamiento (45°C por 1 min.) y extensión (72°C por 1 min. y 40 seg.). La mezcla de reacción se preparó utilizando 5 µl de ADN, 12.5 pmol de cada cebador, 12.5 µl de Master Mix (Fermentas) y el resto se completó con agua molecular (Fermentas) para llegar a un volumen final de 25 µl. En el segundo PCR se utilizaron los cebadores EHR16SR y PLATYS (Cuadro 1), cuyo producto esperado fue de 678 pb. La mezcla de reacción contenía: 1 µl del producto anterior, 12.5 µl del Master Mix (Fermentas), 12.5 pmol de cada cebador y el resto se completó con agua molecular (Fermentas) hasta llegar a un volumen final de 25 µl. Las condiciones para este PCR fueron: una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 1min., 40 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 30 seg.), alineamiento (55°C por 30 seg.) y extensión (72°C por 30 seg.); con una extensión final de 72°C por 5 min., (Martin *et al.*, 2005).

Se realizó una electroforesis con los productos obtenidos en el segundo PCR en geles de agarosa al 1.4% preparados en amortiguador TBE, teñidos con bromuro de etidio y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Las muestras que mostraron banda con tamaño de 678 pb fueron consideradas como positivas a *A. platys*.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en los PCR realizados en el presente estudio.

| Nombre | Secuencia | Especificidad | pb |
|----------------|-------------------------------|---|-----|
| EHR16SD | 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' | Familia | 345 |
| EHR16SR | 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3' | <i>Anaplasmataceae</i> | |
| 8F | 5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3' | <i>A. platys</i> y Secuenciación de <i>A. platys</i> | 678 |
| 1448R | 5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3' | | |
| PLATYS | 5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3' | | |

2.3. Secuenciación

El producto amplificado de una muestra sanguínea que resultó positiva en el PCR para *A. platys* fue purificada con columnas Centricon (Amicon) siguiendo el protocolo que la casa comercial recomienda y se realizó una reacción de secuenciación, que consistió de una temperatura inicial de desnaturalización de 96°C por 1 min., 25 ciclos de desnaturalización de 96°C por 10 seg., alineamiento de 50°C por 5 seg. y extensión de 60°C por 4 min. La secuencia del producto fue determinada usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 y el secuenciador “ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems” del “Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la UCR”. La secuencia obtenida fue analizada con el programa ClustalW2, comparándola con la secuencia del plásmido del gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784).

2.4. Análisis estadístico

Las variables que se analizaron en este estudio se muestran en el Cuadro 2. Las razas de los perros fueron agrupadas en base al largo del pelo (Cuadro 3). Las variables cualitativas (raza, sexo y edad del perro, ubicación de las clínicas veterinarias y época de colecta) se analizaron mediante pruebas de comparación de proporciones múltiples (Chi Cuadrado) y cálculo de valores de riesgo (OR). Las variables cuantitativas (hematocrito, hemoglobina, leucocitos, linfocitos y N° de segmentados) se analizaron mediante comparación de medias de las variables en los grupos de perros con ausencia y presencia de *A. platys* mediante la prueba de t-Student.

Cuadro 2. Variables y categorías analizadas estadísticamente.

| VARIABLE | | CATEGORÍA |
|--------------------------------|------------------------------------|---|
| Variable de respuesta | <i>Anaplasma platys</i> | Positivo Negativo |
| Variables cualitativas | Raza del perro | Pelo largo Pelo medio Pelo corto |
| | Sexo del perro | Macho Hembra |
| | Edad del perro | 1 (0-12 meses) 2 (13-24 meses) 3 (>34 meses) |
| | Ubicación de Clínicas Veterinarias | Heredia Alajuela San José Cartago Guanacaste |
| | Tiempo | Estación seca (Dic 2006- Abr 2007) Estación lluviosa (Ago-Nov 2006 y May-Jul 2007) |
| Variables cuantitativas | Hemograma | Hematocrito Hemoglobina Leucocitos Linfocitos N° de Segmentados |

Cuadro 3. Agrupación de las razas de perros según el largo del pelo.

| Razas de pelo largo | Razas de pelo medio | Razas de pelo corto |
|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Akita | Criollo | Beagle |
| Chow Chow | Mixto | Boxer |
| Cocker Spaniel | Sin raza determinada | Bullterrier |
| Collie | | Bulldog |
| Maltés | | Chihuahua |
| Pastor Ovejero Inglés | | Dachshund |
| Golden Retriever | | Dálmata |
| Husky | | Doberman |
| Pastor Alemán | | Gran Danés |
| Pequinés-Maltés | | Labrador Retriever |
| Poodle | | Pincher |
| Samoyedo | | Rottweiler |
| Shih-Tzu | | Shar-Pei |
| Yorkshire | | Stanford |
| Schnauzer | | Fox Terrier |
| | | Weimeraner |

3. Resultados

De las 300 muestras analizadas mediante PCR para detectar miembros de la familia *Anaplasmataceae*, 131 (43.6%) resultaron positivas, mientras que en el PCR para *A. platys* se detectaron 19 (6.3%) muestras positivas (Figura 1).

Se logró secuenciar una muestra de sangre canina positiva en PCR para *A. platys*. Esta secuencia fue alineada con la secuencia del plásmido del gen 16S ARNr depositada en el GenBank, obteniéndose un porcentaje de homología del 100% (Figura 2).

Al comparar el número de muestras positivas obtenidas en el PCR para *Anaplasmataceae* con el número de muestras positivas obtenidos en el PCR para *A. platys*, se determinó que 5 muestras positivas a *A. platys* no fueron detectadas por el PCR para

Anaplasmataceae (Cuadro 4). De las 117 muestras que resultaron positivas para *Anaplasmataceae* pero negativas para *A. platys*, 55 muestras fueron detectadas positivas a *E. canis* en un estudio previo (Romero, 2008)

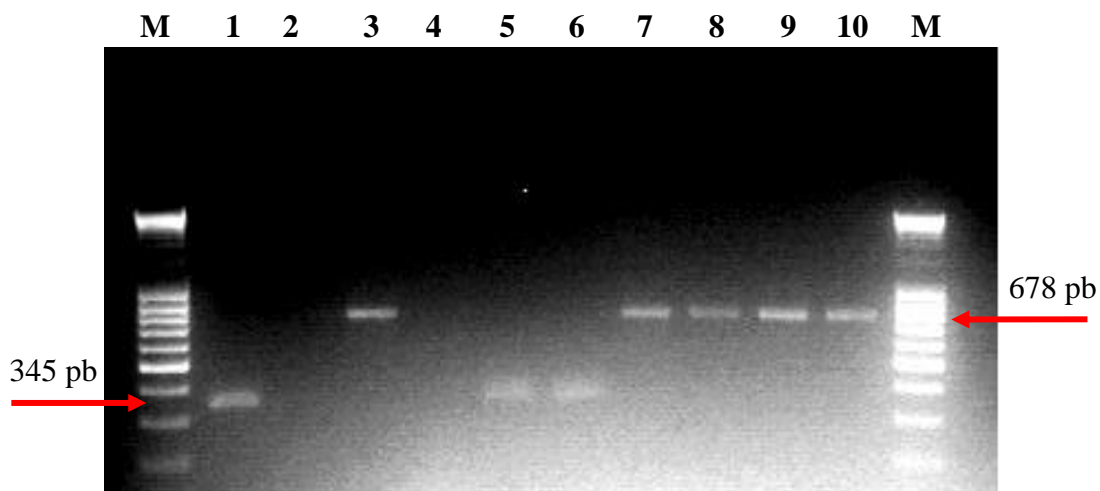


Figura 1. Electroforesis de gel de agarosa de los productos de los PCR mostrando la presencia de *Anaplasmataceae* (amplicón 345 pb; 1, 5, 6) y *A. platys* (amplicón 678 pb; 3, 7-10). M: marcador de peso molecular; 1: control+ *Anaplasmataceae*; 2: control-; 3: control+ *A. platys*; 4: control-; 5-6: muestras caninas + *Anaplasmataceae*; 7-10, muestras caninas positivas *A. platys*.

Las provincias en las que se detectaron muestras caninas positivas para *A. platys* en PCR fueron Alajuela (5), San José (5), Heredia (4), Guanacaste (2) y Cartago (1).

Las características de los perros en los cuales se detectó la presencia de *A. platys* se muestra en el Cuadro 5.

```

A._platys_16S_A      TTTGTCGTAGCTTGCTATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATG 100
A.platys_sangre     -----CTTGCATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATG 40
                      *****

A._platys_16S_A      CATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAA 150
A.platys_sangre     CATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAA 90
                      *****

A._platys_16S_A      TACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTA 200
A.platys_sangre     TACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTA 140
                      *****

A._platys_16S_A      TGTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCACCAAGGCAGTGATCTA 250
A.platys_sangre     TGTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCACCAAGGCAGTGATCTA 190
                      *****

A._platys_16S_A      TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAATACGGTCCA 300
A.platys_sangre     TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAATACGGTCCA 240
                      *****

A._platys_16S_A      GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC 350
A.platys_sangre     GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC 290
                      *****

A._platys_16S_A      TGATCCAGCTATGCCCGGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGAACTC 400
A.platys_sangre     TGATCCAGCTATGCCCGGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGAACTC 340
                      *****

A._platys_16S_A      TTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAAC 450
A.platys_sangre     TTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAAC 390
                      *****

A._platys_16S_A      TCCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGAA 500
A.platys_sangre     TCC-GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGAA 439
                      *** *****

A._platys_16S_A      TTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAAT 550
A.platys_sangre     TTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAAT 489
                      *****

A._platys_16S_A      GCCAGGGCTTAAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTCGAGTCCG 600
A.platys_sangre     GCCAGGGCTTAAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTCGAGTCCG 539
                      *****

A._platys_16S_A      GGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAG 650
A.platys_sangre     GGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAG 589
                      *****

```

Figura 2. Alineamiento de la secuencia de una muestra de *A. platys* obtenida de un perro de Costa Rica (secuencia *A. platys_sangre*) y la secuencia del plásmido del gen 16S ARNr de *A. platys* depositados en el Genbank (*A. platys_16S_A* ARNr) utilizando el programa ClustalW2.

Cuadro 4. Comparación de resultados obtenidos en el PCR para *Anaplasmataceae* y el PCR para *A. platys* en el análisis de 300 sueros caninos.

| PCR para <i>Anaplasmataceae</i> | PCR para <i>A. platys</i> | | | |
|---------------------------------|---------------------------|-----|-----|-------|
| | | + | - | Total |
| | + | 14 | 117 | 131 |
| | - | 5 | 164 | 169 |
| Total | 19 | 281 | 300 | |

Cuadro 5. Características de los perros positivos a *A. platys* mediante PCR.

| Variable | Categoría | n | % (caninos positivos a <i>A. platys</i>) |
|-----------------------|-------------|-----|---|
| Raza del perro | Pelo largo | 64 | 3.13% (2) |
| | Pelo medio | 37 | 10.81% (4) |
| | Pelo corto | 40 | 2.50% (1) |
| | Sin datos | 159 | 7.55% (12) |
| Edad del perro | 0-12 meses | 22 | 9.09 (2) |
| | 13-24 meses | 19 | 5.26 (1) |
| | >24 meses | 125 | 4.80 (6) |
| | Sin datos | 134 | 7.46% (10) |
| Sexo del perro | Macho | 116 | 5.17% (6) |
| | Hembra | 93 | 7.53% (7) |
| | Sin datos | 91 | 6.59% (6) |

Ninguna de las variables cualitativas analizadas (raza, sexo y edad del perro, ubicación de clínica veterinaria y época de colecta) mostró tener un efecto significativo sobre la presencia de *A. platys* al realizar pruebas de comparación de proporciones múltiple para cada una de estas variables (Cuadro 6).

Tampoco se pudo determinar diferencias estadísticas entre las variables cuantitativas del hemograma (hematocrito, hemoglobina, leucocitos, linfocitos y número de segmentados) y el grupo de perros positivos a *A. platys* mediante la prueba de t-Student (Cuadro 7).

Cuadro 6. Resultados del análisis estadístico de las variables cualitativas de los perros positivos a *A. platys*.

| Efecto | Pr>Chi ² | Clases | OR | IC 95% |
|--|---------------------|-------------|-------|----------------|
| Raza del perro | 0.9906 | Medio | 1 | - |
| | | Corto | 0.842 | 0.051 - 14.007 |
| | | Largo | NE* | NE |
| Sexo del perro | 0.5503 | Macho | 1 | - |
| | | Hembra | 1.738 | 0.283 - 10.655 |
| Edad del perro | 0.7028 | >24 meses | 1 | - |
| | | 0-12 meses | 2.85 | 0.247 - 32.929 |
| | | 13-24 meses | NE | NE |
| Ubicación clínicas veterinarias | 0.9153 | San José | 1 | - |
| | | Alajuela | 1.477 | 0.239 - 9.128 |
| | | Heredia | 1.285 | 0.208 - 7926 |
| Época de colecta | 0.8318 | Seca | 1 | - |
| | | Lluviosa | 0.796 | 0.096 - 6.568 |

*Efecto no estimable; IC95%: intervalo de confianza; OR: odds ratios; Pr: probabilidad.

Cuadro 7. Resultado del análisis estadístico de las variables cuantitativas del hemograma de perros negativos (1) y positivos (2) a *A. platys*.

| Variable | N ₁ | \bar{X}_1 | N ₂ | \bar{X}_2 | $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ | Pr > t |
|--------------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|-------------------------|---------|
| Hematocrito | 227 | 35.36 | 6 | 35.67 | 0 | 0.945 |
| Hemoglobina | 225 | 12.21 | 6 | 11.98 | 0.23 | 0.8752 |
| Leucocitos | 225 | 11129.00 | 6 | 8642.50 | 2486.20 | 0.3198 |
| Linfocitos | 224 | 28.96 | 6 | 30.33 | -1.37 | 0.7831 |
| Nº de Segmentados | 224 | 65.14 | 6 | 66.00 | -0.86 | 0.8612 |

N₁: número de negativos; N₂: número de positivos; \bar{X}_1 : media de grupo de negativos; \bar{X}_2 : media de grupo de positivos; Pr: probabilidad.

4. Discusión

En el presente estudio se reporta por primera vez la detección molecular de *A. platys* en 19 perros en Costa Rica. El porcentaje de muestras positivas a *A. platys* determinado en este estudio fue de 6%, resultado que concuerda con los estudios reportados en Venezuela e Italia con un 6% y 4%, respectivamente (Huang *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*; 2006).

La razón por la que en el PCR para *Anaplasmataceae* se detectó un total de 131 (44%) muestras positivas se debe a que esta técnica permite detectar otras especies de la familia, además de *A. platys* (Inokuma *et al.*, 2000). Un total de 14 muestras resultaron positivas en las dos técnicas (PCR para *Anaplasmataceae* y PCR para *A. platys*) mientras que 117 muestras dieron positivas únicamente al PCR para *Anaplasmataceae*. En un estudio previo (Romero, 2008) se detectó que de estas 117 muestras, 55 resultaron positivas a *E. canis*. Las restantes 69 muestras que resultaron positivas al PCR de *Anaplasmataceae* pero negativas a *A. platys*, *E. canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis* probablemente se deba a la presencia de otros agentes de la familia *Anaplasmataceae*, ya sea *A. phagocytophilum* u otro agente relacionado al género *Ehrlichia* (Allsopp y Allsopp, 2001; Lester *et al.*, 2005; Inokuma *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman lo reportado en la literatura, sobre la falta de sensibilidad de detectar *A. platys* con el PCR para *Anaplasmataceae* (Martin *et al.*, 2005), ya que 5 muestras que resultaron positivas en el PCR para *A. platys* resultaron negativas en el PCR de *Anaplasmataceae*.

Al observar los resultados obtenidos en el presente estudio con los resultados previos de Romero, 2008, se determinó que de un total de 212 muestras analizadas para detectar la presencia de *A. platys* y *E. canis* 7 (3%) mostraron infección mixta.

El porcentaje de homología encontrado en la secuenciación de *A. platys* en este estudio (100%) confirma, que el producto amplificado corresponde al gen 16S ARNr de *A. platys*.

No se encontró efecto significativo para las variables estudiadas sobre la presencia de *A. platys*. Este resultado se debe probablemente, a que el banco de sueros utilizado en el presente trabajo fue colectado para otros propósitos (detección de *Ehrlichia* spp.), al tamaño de muestras analizadas y a la falta de datos de algunas de estas muestras. Sin embargo, se determinó la presencia de *A. platys* distribuída en diferentes áreas geográficas del país, lo que concuerda con estudios previos (Ábrego, 2008) sobre la detección de *A. platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* en las provincias de Alajuela y Heredia.

5. Conclusiones

- Se detectó por primera vez *A. platys* en muestras de sangre de perros de diferentes provincias (San José, Heredia, Alajuela, Cartago y Guanacaste) de Costa Rica.
- Se determinó una baja sensibilidad del PCR para *Anaplasmataceae* para detectar *A. platys* en muestras de sangre de perros.
- Se demostró un 100% de similitud de la secuencia obtenida de un canino de Costa Rica con el gen 16S ARNr de *A. platys* publicado en el Genbank.

- Se encontró infección mixta con *A. platys* y *E. canis* en 7 muestras de sangre de perros.
- No se determinó un efecto significativo de ninguna de las variables cualitativas y cuantitativas analizadas en el presente estudio entre grupos de perros positivos y negativos a *A. platys*.

6. Recomendaciones

- Informar a los médicos veterinarios sobre la presencia de *A. platys* afectando a perros de Costa Rica.
- Continuar con el estudio de detección de *A. platys* con un tamaño de muestra representativo del país, que permita conocer la prevalencia de este agente en perros de Costa Rica.
- Determinar posible presencia de otros miembros de la familia *Anaplasmataceae* en perros de Costa Rica.

7. Referencias Bibliográficas

- Abrego, L. 2008. Detección de *Anaplasmataceae* en garrapatas colectadas de perros y *Anaplasma platys* en muestras de sangre de perros de Costa Rica mediante la técnica de PCR (Tesis). Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional, 48p.
- Aguirre, E., M. A. Tesouro, L. Ruiz, I. Amusatogui and A. Sainz. 2006. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. J. Vet. Med. 53:197-200.
- Allsopp, M. T. E. P. and B. A. Allsopp. 2001. Novel Ehrlichia genotype detected in dogs in south Africa. J. Clin. Microbiol. 39(11):4204-4207.
- Arraga-Alvarado, C., M. Palmar, O. Parra and P. Salas. 2003. *Ehrlichia platys (Anaplasma platys)* in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. Vet. Pathol. 40:149-156.
- Baker, D. C., M. Simpson, S. D. Gaunt and R. E. Corstvet. 1987. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. Vet. Pathol. 24:449-453.
- Beaufils, J. P., H. Inokuma, J. Martin-Granel, P. Jumelle, M. Barbault-Jumell and P. Brouqui. 2002. *Anaplasma platys (Ehrlichia platys)* infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. Rev. Med. Vet. 153:85-90.
- Brown, G. K., A. R. Martin, T. K. Roberts and R. J. Aitken. 2001. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust. Vet. 79:554-558.
- Brown, G. K., P. J. Canfield, R. H. Dunstan, T. K. Roberts, A. R. Martin, C. S. Brown and R. Irving. 2006. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. Aust. Vet. J. 84(9):321-325.
- Chang, W. L. and M. J. Pan. 1996. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. J. Clin. Microbiol. 34:3142-3146.
- De la Fuente, J., A. Torina, V. Naranjo, S. Nicosia, A. Alongi, F. La Mantia and K. M. Kocan. 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. BMC Veterinary Research. 2:24.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales* : Unification of some species of *Ehrlichia* and *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:2145-2165.

- French, T. W. and J. W. Harvey. 1983. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Vet. Res.* 44(12):2407-2411.
- Harrus, S., I. Aroch, E. Lavy and H. Bark. 1997. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytoenia. *Vet. Rec.* 141: 247-250.
- Harvey, J. W., C. F. Simpson and J. M. Gaskin. 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs.
- Heyman, P., D. Duh, B. Van Der Kuylen, C. Cochez, M. Van Esbroeck, C. Vandenvelde and T. Avsic-Zupanc. 2007. Molecular and serological evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia* sp. Infection in a dog, imported in Belgium, from southern Spain. *J. Vet. Med.* 54:276-279.
- Huang, H., A. Unver, M. J. Pérez, N. G. Orellana and Y. Rikihisa. 2005. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz. J. Microbiol.* 36:211-216.
- Inokuma, H., D. Raoult and P. Brouqui. 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown Dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38(11):4219-4221.
- Inokuma, H., K. Kujii, K. Matsumoto, M. Okuda, K. Nakagome, R. Kosugi, M. Hirakawa and T. Onishi. 2002. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet. Parasitol.* 110:145-152.
- Inokuma, H., K. Ohno, T. Onishi, D. Raoult and P. Brouqui. 2001. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi an Okinawa Prefecture. *Jpn. J. Vet. Med. Sci.* 63:815-817.
- Inokuma, H., M. Oyamada, P. J. Kelly, L. A. Jacobson, P-E. Fournier, K. Itamoto, M. Okuda and P. Brouqui. 2005. Molecular detection of new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* canine blood from south Africa. *J. Clin. Microbiol.* 43(6):2934-2937.
- Kontos, V. I., O. Papadopoulos and T. W. French. 1991. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet. Clin. Pathol.* 20:101-105.
- Lester, S. J., E. B. Breitschwerdt, C. D. Collis and B. C. Hegarty. 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Can. Vet. J.* 46:825-827.
- Martin, A. R., G. K. Brown, R. H. Dunstan and T. K. Roberts. 2005. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp. Parasitol.* 109(3):176-180.

- Mathew, J. S., S. A. Ewing, G. L. Murphy, K. M. Kocan, R. E. Corstvet and J. C. Fox. 1997. Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (order Rickettsiales) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 68:1-10.
- Motoi, Y., H. Satoh, H. Inokuma, T. Kiyuuna, Y. Muramatsu, H. Ueno and C. Morita. 2001. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol.* 45(1):89-91.
- Pinyoowong, D., S. Jittapalapong, F. Suksawat, R. W. Stich and Arinthip Thamchaipenet. 2007. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. *Infect.* (en prensa).
- Romero, L. 2008. Detección molecular de especies de *Ehrlichia* en perros de Costa Rica (Tesis). Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional, 70p.
- Sainz, A., I. Amusatogui and M. A. Tesouro. 1999. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11(4):382-384.
- Simpson, R. M., S. D. Gaunt, J. A. Hair, K. M. Kocan, W. G. Henk and H. W. Casey. 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.* 52:1537-1541.
- Suksawat, J., C. Pitulle, C. Arraga-Alvarado, K. Madrigal, S. I. Hancock and E. B. Breitschwerdt. 2001. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *J. Clin. Microbiol.* 39(1):90-93.
- Unver, A., Y. Rikihisa, M. Kawahara and S. Yamamoto. 2003. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990:692-698.
- Wilson, J. F. 1992. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 28: 381-383.

ANEXO

Ficha de datos recolectados para cada una de las garrapatas analizadas.

| | |
|---|--|
| ID _____ | |
| Nombre de Clínica Veterinaria _____ | |
| Fecha de colecta _____ | |
| *Propietario y teléfono _____ | |
| Provincia _____ | Cantón _____ |
| Raza _____ | Edad _____ |
| Sexo | <input type="checkbox"/> H ♀ <input type="checkbox"/> M ♂ |
| Nombre _____ | |
| Cantidad de garrapatas infestando al perro: | <input type="checkbox"/> 1-10 <input type="checkbox"/> más de 10 |
| Cantidad de garrapatas colectadas _____ | |
| Primera vez con presencia de garrapatas | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No |
| Desde cuando _____ | |
| Esta siendo o va a ser tratado contra garrapatas | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No , cuál _____ |
| Presencia de síntomas relacionados con Ehrlichiosis | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No |
| Se le realizó prueba diagnóstica | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No cuál _____ |
| Esta siendo o va a ser tratado contra ehrlichiosis | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No cuál _____ |