

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

Prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* en sangre y garrapatas de perros que visitan parques públicos de Costa Rica

**Tesis para optar por el título de Licenciatura en
Medicina Veterinaria**

Marta Cristina Bonilla González

**Tutora: Ph.D. Gaby Dolz Wiedner
Cotutor: Ph.D. Víctor M. Montenegro Hidalgo**

**Lectores:
Ph.D. Ana Eugenia Jiménez Rocha
Ph.D. Juan José Romero Zúñiga**

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2014

“Prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* en sangre y garrapatas de perros que visitan parques públicos de Costa Rica”

Tribunal Examinador

Dr. Rafael Ángel Vindas Bolaños
Vicedecano

Dra. Laura Castro Ramírez
Directora

Dra. Gaby Dolz Wiedner
Tutora

Dr. Víctor M. Montenegro Hidalgo
Cotutor

Dra. Ana E. Jiménez Rocha
Lectora

Dr. Juan José Romero Zúñiga
Lector

Fecha: _____

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad, la guía y sabiduría para realizar este proyecto.

A mis padres, que me dan todo su apoyo siempre.

A mi hermana, quien me acompaña siempre en todos mis proyectos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gaby Dolz y a todo el personal del Laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, por toda su ayuda en estos años.

Al Dr. Víctor Montenegro Hidalgo, mis lectores el Dr. Juan José Romero Zúñiga y la Dra. Ana E. Jiménez Rocha, quienes han estado conmigo en muchas situaciones durante toda la carrera.

A Jorge Hernández, que ha sido un gran compañero de trabajo y amigo.

A mis amigos, Osvaldo, Fernanda, Andrea y Jason, por compartir tantos años conmigo.

A Connie, quien estuvo conmigo en la realización de las pruebas de laboratorio.

Y a todas las personas, amigos y compañeros de la Escuela de Medicina Veterinaria, quienes siempre han estado brindándome su afecto en el transcurso de estos años.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia, distribución y epidemiología	1
1.2 Etiología	4
1.3 Transmisión	4
1.4 Patogénesis	6
1.5 Signos clínicos	7
1.6 Diagnóstico	9
1.7 Prevención, control y tratamiento	11
1.8 Justificación e importancia	12
1.9 Hipótesis	13
1.10 Objetivos	14
<i>1.10.1 Objetivo general</i>	14
<i>1.10.2 Objetivos específicos</i>	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Tipo de estudio	15
2.2 Procedencia, tipo y tamaño de la muestra	15
2.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	19
2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
<i>2.4.1 Extracción de ADN</i>	20
<i>2.4.2 La PCR convencional para A. phagocytophilum</i>	20
<i>2.4.3 La PCR convencional para A. platys</i>	21
2.5 Secuenciación	22
2.6 Análisis estadístico	23
3. RESULTADOS	24
3.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para A. phagocytophilum	24
3.2 La PCR convencional para A. phagocytophilum	27
3.3 La PCR convencional para A. platys	28
3.4 Secuenciación de las muestras positivas de A. phagocytophilum y A. platys	31
3.5 Infecciones pasadas y activas de A. phagocytophilum y A. platys	32
4. DISCUSIÓN	33
5. CONCLUSIONES	40
6. RECOMENDACIONES	41
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
8. ANEXOS	48

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tipo y número de muestras analizadas por parque público.....	18
Cuadro 2. Características de los 11 perros seropositivos para <i>A. phagocytophilum</i>	25
Cuadro 3. Valores hematológicos de los 11 perros seropositivos para <i>A. phagocytophilum</i>	26
Cuadro 4. Características de las cuatro perras positivas en la PCR de <i>A. platys</i>	30
Cuadro 5. Valores hematológicos de las cuatro perras positivas en la PCR de <i>A. platys</i>	30

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Adición de 10 µl de cada suero diluido a cada pocito de la lámina de IFI.....	19
Figura 2. Reacción positiva (A) y negativa (B) de sueros caninos en la IFI de <i>A. phagocytophilum</i>	24
Figura 3. Electroforesis de gel de agarosa de una muestra de sangre positiva en la PCR de <i>A. phagocytophilum</i>	27
Figura 4. Electroforesis de gel de agarosa de una muestra de sangre positiva en la PCR de <i>A. platys</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CDC: Centro de Control de Enfermedades

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Inmunoensayo enzimático

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

NCBI: Centro Nacional de Información para Biotecnología (National Center for Biotechnology Information).

PBS: Buffer Fosfato Salino, por sus siglas en ingles

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RESUMEN

Este estudio reporta por primera vez la prevalencia de *A. phagocytophilum* y *A. platys* en perros que visitan los parques públicos de Costa Rica. Se analizaron un total de 408 sueros, 374 sangres y 122 grupos de garrapatas de perros que visitaron parques recreativos de Costa Rica durante los años 2011 y 2012, para determinar la seroprevalencia de *A. phagocytophilum* y la prevalencia de *A. phagocytophilum* y *A. platys* en los perros y sus garrapatas. De un total de 408 sueros, 11 perros (2.7%) resultaron positivos en la Inmunofluorescencia Indirecta de *A. phagocytophilum*, estos mismos perros se determinaron con infección pasada. De 374 muestras de sangre, un perro (0.3%) resultó positivo en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de *A. phagocytophilum*, éste provenía del Parque Central de Cañas, Guanacaste, y éste mismo perro fue determinado con infección activa de *A. phagocytophilum*. De 122 grupos de garrapatas analizados, un grupo (0.8%) de garrapatas *R. sanguineus* resultó positivo en la PCR de *A. phagocytophilum*, este grupo de garrapatas pertenecía a un perro que provenía del Parque de La Paz, San José. De un total de 374 muestras de sangre de perro analizadas en la PCR para *A. platys*, resultaron positivas cuatro perros (1%), dos que provenían del Parque Central de Cañas, Guanacaste, y dos del Parque Central de Quebrada Ganado, Puntarenas, estos cuatro perros fueron determinados con infección activa de *A. platys*. De los 122 grupos de garrapatas analizados en la PCR para *A. platys*, ninguna de las muestras resultó positiva.

ABSTRACT

This study reports for the first time the prevalence of *A. phagocytophilum* and *A. platys* in dogs who visited public parks of Costa Rica. During 2011 and 2012 a total of 408 serum samples, 374 blood samples and 122 groups of ticks were collected from dogs who visited recreational parks of Costa Rica, and analyzed to determine the seroprevalence of *A. phagocytophilum* and the prevalence of *A. phagocytophilum* and *A. platys*. From a total of 408 sera analyzed with Indirect Immunofluorescence Assay, 11 (2.7 %) reacted positive for *A. phagocytophilum*, the dogs were determined with past infections. Of 374 blood samples analyzed with Polymerase Chain Reaction (PCR), only one dog (0.3 %) from Parque Central de Cañas, Guanacaste, was determined positive for *A. phagocytophilum*, this dog was determined with active infection of *A. phagocytophilum*. From 122 groups of ticks analyzed, one *R. sanguineus* group (0.8 %) was detected positive for *A. phagocytophilum* in PCR, this group of ticks was found on a dog from Parque de La Paz, San Jose. From the total of 374 blood samples analyzed with PCR for the presence of *A. platys*, four dogs (1%) yielded positive results, two from Parque Central de Cañas, Guanacaste and two from Parque Central de Quebrada Ganado, Puntarenas, these four dogs were determined with active infection of *A. platys*. None of the ticks were positive to *A. platys*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia, distribución y epidemiología

Anaplasma phagocytophilum es el agente causal de la anaplasmosis granulocitotrópica y *Anaplasma platys* el de la anaplasmosis trombocitotrópica. Se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, además dependen mucho de la distribución de sus vectores y las condiciones que permitan que estos se desarrollen. Ambos agentes tienen como principales vectores a las garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* spp. para *A. platys* y *A. phagocytophilum*, respectivamente (Scanlan, 1991; Mullen & Durden, 2002; McGavin & Zachary, 2006; Woldehiwet, 2010).

A. phagocytophilum se describió por primera vez en humanos en Estados Unidos en el año 1994 (Arraga-Alvarado, 1994; Oteo & Brouqui, 2005; Anda et al., 2007). El primer caso reportado de un perro infectado con *A. phagocytophilum* se dio en Vancouver en el 2005 y se comprobó mediante serología y estudios moleculares (Greene, 2012). En el 2007 se reportó por primera vez en Chile el hallazgo de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* en sueros de perros mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (López et al., 2007).

El primer reporte de *A. platys* (antes denominada *Ehrlichia platys*) se dió en Florida, Estados Unidos encontrando inclusiones en las plaquetas de perros que sufrían trombocitopenia (Arraga-Alvarado et al., 2003; Paulino-Ruiz, 2011). En 1983 French y Harvey describen una inmunofluorescencia para detectar anticuerpos de *A. platys* en el suero (Arraga-Alvarado et al., 2003). En Venezuela, se encuentran reportes de diagnósticos de *A. platys* en perros desde 1982 (Arraga-Alvarado et al., 2003; Cardozo et al., 2009).

A. phagocytophilum fue reportado por primera vez en Costa Rica por Soto (2010). En este estudio se analizaron 34 muestras de sangre de venados cola blanca, por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De estas, una muestra fue positiva para este agente, lo cual es de gran importancia, ya que los venados cola blanca se consideran reservorios de *A. phagocytophilum*. Además, este agente fue detectado por primera vez en perros de Costa Rica por Campos (2011). En este estudio se analizaron 342 muestras de ácido dexoirribonucleico (ADN) de sangre de perros, sospechosos de sufrir ehrlichiosis, además de 160 garrapatas de estos perros. Un total de tres (0.9%) muestras de sangre de perros y dos (1.25%) garrapatas *R. sanguineus* resultaron positivas.

A. platys fue reportado por primera vez en Costa Rica por Ábrego (2008). En este estudio se analizaron 300 muestras de sangre de perros, sospechosos de sufrir ehrlichiosis y anaplasmosis, provenientes de San José, Heredia, Alajuela, Cartago y Guanacaste. También se analizaron 165 garrapatas recolectadas de estos animales. Se determinó 19 muestras de sangre (6.33%) positivas para *A. platys* (cinco de San José, cuatro de Heredia, cinco de Alajuela, una de Cartago y dos de Guanacaste). Del total de garrapatas analizadas, cinco *R. sanguineus* (3.03%) resultaron positivas para *A. platys*. Una muestra de *A. platys* proveniente de sangre de perro y otra de una garrapata *R. sanguineus* fueron secuenciadas, y mostraron similitudes de 100% y 98% respectivamente, con las secuencias almacenadas en el GenBank para *A. platys* (Ábrego, 2008).

En otro estudio sobre la presencia de *A. platys* en sangre de 146 perros de cuatro lugares (Chomes, San Ramón, Keköldi y Liberia) de Costa Rica, se encontró 14 (10%) positivos mediante PCR, siete provenían de Chomes, Puntarenas y siete de Liberia, Guanacaste. También se encontró, que de los 14 perros que fueron positivos en PCR a *A. platys*, nueve (64.3%) tenían infestación con *R. sanguineus* en el momento de la toma de muestra (Rojas et al., 2014).

En el 2007 se reportó dos casos de pacientes masculinos que acudieron al Hospital Calderón Guardia y al Hospital México en Costa Rica con fiebre, cefalea, mialgia, náuseas, vómito, malestar general y valores hematológicos alterados. Al realizarles un frotis sanguíneo se determinaron inclusiones en los granulocitos en ambos pacientes. A los dos pacientes se les administró doxiciclina y respondieron favorablemente al tratamiento (Hernández-de Mezerville & Padilla-Cuadra, 2007; Rojas-Solano & Villalobos-Vindas, 2007). En el 2011 se reportaron otros dos casos de pacientes masculinos que acudieron al hospital con sintomatología similar e inclusiones en los granulocitos. Además se estableció leucopenia y trombocitopenia en ambos pacientes, a estos se les administró también doxiciclina respondiendo favorablemente al tratamiento (Brenes-Valverde et al., 2011). En estos cuatro posibles casos de humanos con ehrlichiosis o anaplasmosis en Costa Rica, no se logró determinar el agente infeccioso, ya que los hospitales no contaban con técnicas serológicas ni moleculares para diagnosticar *Ehrlichia ewingii* o *A. phagocytophilum* en humanos (Hernández-de Mezerville & Padilla-Cuadra, 2007; Rojas-Solano & Villalobos-Vindas, 2007; Brenes-Valverde et al., 2011).

1.2 Etiología

A. phagocytophilum y *A. platys* pertenecen al orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*. Estas especies pertenecían antes al género *Ehrlichia*; por lo que se les conocía como *Ehrlichia equi* o *Ehrlichia phagocytophila* y *Ehrlichia platys*, respectivamente (Ettinger & Feldman, 2010; Gyles et al., 2010; Greene, 2012). Son bacterias intracelulares obligadas, gram negativas, que afectan en el caso de *A. phagocytophilum*, granulocitos (neutrófilos) y en el caso de *A. platys* plaquetas (Solano-Gallego et al., 2006; Goddard, 2008; Ramsey & Tennant, 2012). Una vez dentro de su célula blanco, los agentes se replican por fisión binaria, pudiendo llegar a formar entre quince a veinte organismos en cada célula y estos organismos son los que van a formar las mórulas que se observan dentro de éstas (Forbes et al., 2009; Woldehiwet, 2010; Greene, 2012).

1.3 Transmisión

Para la transmisión de estos agentes es necesario un vector que se alimente de un hospedador infectado para luego transmitir las bacterias a otros hospedadores susceptibles. La garrapata es el principal vector de los dos agentes en estudio (Scanlan, 1991; McGavin & Zachary, 2006; Ramsey & Tennant, 2012).

El género *Ixodes* spp. es el principal vector de *A. phagocytophilum* y *R. sanguineus* de *A. platys* (Morgan et al., 2004; Yabsley et al., 2008; Bowman, 2009; Greene, 2012). Algunos autores consideran además a *Dermacentor silvarum* (Carrade et al., 2009), *Haemaphysalis punctata* (Stuen, 2007; Gyles et al., 2010; Woldehiwet, 2010) y *R. sanguineus* (Stuen, 2007) como posibles vectores para *A. phagocytophilum*. En el caso de *A. platys*, se han reportado *Amblyomma* sp. (Parola, 2007), *Dermacentor auratus* (De la Fuente et al., 2006; Greene, 2012), *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis longicornis* (Greene, 2012) y *Hyalomma truncatum* (De la Fuente et al., 2006) como posibles vectores. Además, en Australia, se determinó la presencia de *A. platys* en un piojo masticador (*Heterodoxus spiniger*) proveniente de un perro (Greene, 2012). No se ha reportado la transmisión transovárica de estos agentes en las garrapatas, pero sí la transmisión transtadial (Mullen & Durden, 2002; Ettinger & Feldman, 2010; Rikihisa, 2011).

Una vez que el vector biológico adquiere el agente de un hospedador infectado, las bacterias producen una infección en las glándulas salivales de las garrapatas, transmitiendo así las anaplasmas a otro hospedador susceptible cuando se alimentan de este (Rikihisa, 2011; De Farias-Rotondano et al., 2012; Greene, 2012). Las garrapatas necesitan entre 24 a 48 horas de alimentación para poder transmitir la enfermedad a los animales susceptibles (Taylor et al., 2007; Carrade et al., 2009; Ettinger & Feldman, 2010).

A. phagocytophilum tiene una gran variedad de animales salvajes que pueden fungir como reservorios, entre estos el venado cola blanca, diferentes especies de ratones, ardillas y algunas aves migratorias, que además de actuar como reservorios, pueden ayudar a esparcir las garrapatas infectadas. Los animales que son comúnmente afectados por esta bacteria son los animales domésticos como caballos, vacas, ovejas, cabras, gatos, perros y también humanos, lo que hace importante su estudio, al considerarse una enfermedad zoonótica (Lillini et al., 2006; Stuen, 2007; Yabsley et al., 2008; Gyles et al., 2010).

Los reservorios reconocidos de *A. platys*, son hasta el momento los caninos salvajes y pequeños rumiantes, los cuales van a transmitir este agente a los caninos domésticos o salvajes y pequeños rumiantes susceptibles a la enfermedad (Greene, 2012).

1.4 Patogénesis

Una vez que la garrapata adquirió el agente, ésta puede transmitirle las bacterias al hospedador susceptible (Taylor et al., 2007; Carrade et al., 2009; Ettinger & Feldman, 2010). El periodo de incubación de estos dos agentes en caninos es de ocho a quince días (Carrada et al., 2009; Greene, 2012). Una vez que el agente se encuentra dentro del hospedador, éste busca las células blanco e ingresa por medio de endocitosis (Gyles et al., 2010; Rikihisa, 2011). Las células blanco de *A. phagocytophilum* son los granulocitos (neutrófilos) y en el caso de *A. platys* las plaquetas (Solano-Gallego et al., 2006; Goddard, 2008; Ramsey & Tennant, 2012).

Dentro de la célula blanco, los agentes envían señales para inhibir la apoptosis celular y esto facilita la replicación del agente en las células (Taylor et al., 2007; Oteo & Brouqui, 2005; Greene, 2012). Las anaplasmas se replican por fisión binaria, pudiendo llegar a formar entre quince a veinte organismos en cada célula. Estos agentes se aglomeran en el citoplasma de las células dentro de una vacuola formando inclusiones que se denominan mórulas. Estas mórulas son comúnmente observadas en las muestras de sangre periférica (Oteo & Brouqui, 2005; Forbes et al., 2009; Woldehiwet, 2010; Greene, 2012).

Finalmente las bacterias son liberadas mediante lisis celular e infectan otras células. En el hospedador ocurre una inmunosupresión que tiene como consecuencia la aparición de infecciones oportunistas (Oteo & Brouqui, 2005; Taylor et al., 2007; Greene, 2012). La bacteremia de las anaplasmas en perros y humanos, es generalmente menor a los 28 días, por lo que es común que las infecciones se resuelvan por si solas en pocos días (Greene, 2012).

1.5 Signos clínicos

Los signos clínicos más comunes que presentan los caninos, una vez infectados con *A. phagocytophilum* son fiebre, letargia, depresión, anorexia, debilidad, rigidez, cojera, hepatomegalia y esplenomegalia. En los exámenes laboratoriales se observa una leve o moderada trombocitopenia y linfopenia, una leve anemia e hipoalbuminemia, además eosinopenia y monocitosis. Muy pocos pacientes muestran signos de trastornos de coagulación, como por ejemplo petequias, melena o epistaxis (Lillini et al., 2006; Rikihisa, 2011; Greene, 2012).

En humanos se ha descrito la infección autolimitante, por lo que es raro que este agente ocasione la muerte. Dos de los síntomas más comunes en las infecciones de *A. phagocytophilum* en humanos son los dolores de cabeza y la confusión del paciente (Lillini et al., 2006; Stuen, 2007; Greene, 2012).

La forma asintomática es la más común en caninos con infecciones por *A. platys* (Morgan et al., 2004; McGavin & Zachary, 2006; Ábrego, 2008; Ettinger & Feldman, 2010). Algunos síntomas que podrían presentarse en animales inmunosuprimidos son fiebre leve, petequias, mucosas pálidas, inapetencia, letargia, pérdida de peso, entre otros. Los hallazgos a nivel del laboratorio son primordialmente una trombocitopenia marcada (Morgan et al., 2004; De Farias-Rotondano et al., 2012; Greene, 2012).

Tanto *A. phagocytophilum* como *A. platys* pueden predisponer a infecciones oportunistas, lo que comúnmente agrava el cuadro clínico en perros y humanos. Además, pueden existir coinfecciones en un mismo hospedador (Morgan et al., 2004; Lillini et al., 2006; Yabsley et al., 2008; Bowman, 2009). En Estados Unidos se encontró en caninos infectados con *A. phagocytophilum* y *Borrelia burgdorferi* síntomas más graves, comparados a los que solo mostraban infección con *A. phagocytophilum* (Ettinger & Feldman, 2010; Rikihisa, 2011; Greene, 2012).

En el estudio de Ábrego (2008), con perros sospechosos de sufrir ehrlichiosis y anaplasmosis, no se pudo determinar una asociación estadísticamente significativa entre las variables cualitativas (raza, sexo y edad del perro, ubicación de clínica veterinaria y época de colecta), y cuantitativas del hemograma (hematocrito, hemoglobina, leucocitos, linfocitos y número de segmentados) con la infección por *A. platys* en perros.

Mientras que en el estudio de Rojas et al. (2014), se encontró una asociación significativa entre la infección por *A. platys* y los síntomas de letargia, fiebre, condición corporal mala, inyección escleral y valores bajos del volumen del paquete celular.

Las reinfecciones se pueden dar con ambos agentes, ya que los títulos de anticuerpos disminuyen después de aproximadamente ocho meses de eliminada la bacteria (Ettinger & Feldman, 2010; Woldehiwet, 2010; De Farias-Rotondano et al., 2012).

1.6 Diagnóstico

Para el diagnóstico de estos agentes existen diversas pruebas que se pueden realizar en los laboratorios para determinar la presencia o exposición al agente (Yabsley et al., 2008; Forbes et al., 2009; Ramsey & Tennant, 2012).

Se pueden realizar frotis sanguíneos, en los que se va a encontrar las mórulas intracelulares en las células blanco (Scanlan, 1991; Taylor et al., 2007; Ramsey & Tennant, 2012). Este método aunque es barato, rápido y fácil de realizar, tiene una baja sensibilidad y es poco específico y subjetivo, ya que pueden confundirse las inclusiones, con las de otros organismos o inclusiones de material nuclear (Goddard, 2008; Carrada et al., 2009; De Farias-Rotondano et al., 2012). En el caso de *A. phagocytophilum*, las inclusiones además son indistinguibles morfológicamente de las que produce *E. ewingii*, por lo que habría que recurrir a otros métodos para determinar y confirmar la presencia del agente (Carrade et al., 2009; Ettinger & Feldman, 2010; Greene, 2012).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoensayo enzimático (ELISA) y Western-Blot permiten determinar la exposición de los animales a los agentes (Parola, 2007; Forbes et al., 2009; Ramsey & Tennant, 2012). Estas técnicas detectan anticuerpos circulantes, los cuales pueden persistir alrededor de ocho meses luego de la eliminación del agente; por lo tanto, obtener un resultado positivo en estas pruebas, no significa que se encuentre el agente en el hospedador, sino que hubo una exposición previa.

Finalmente, pueden ocurrir falsos negativos en animales que están incubando la enfermedad, ya que los anticuerpos tardan cerca de ocho días en aparecer y ser diagnosticados. Otro factor que hay que tomar en cuenta, es que pueden ocurrir reacciones cruzadas, las cuales se han reportado entre *A. phagocytophilum* y *A. platys* (De la Fuente et al., 2006; Taylor et al., 2007; Greene, 2012).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las pruebas más confiables para determinar la presencia del agente en el momento de la toma de la muestra. Las ventajas que posee son su alta especificidad y sensibilidad, por consiguiente se puede determinar con certeza la presencia del agente infectante, y así establecer infecciones activas e identificar animales reservorios (Parola, 2007; Forbes et al., 2009; De Farias-Rotondano et al., 2012).

El cultivo celular es la prueba de oro que permite identificar a *A. phagocytophilum* y *A. platys*, sin embargo esta prueba puede presentar una serie de desventajas, por ejemplo esta prueba se realiza en muy pocos laboratorios, ya que se necesita un laboratorio con un mínimo de bioseguridad de grado tres, personal especializado y el costo de la técnica es elevado.

Otra desventaja que tiene el cultivo de estos agentes, es que en el caso de *A. phagocytophilum* pueden existir variantes patogénicas del agente que no se puedan cultivar en el medio normalmente utilizado (Oteo & Brouqui, 2005; Anda et al., 2007). En el caso de *A. phagocytophilum* la línea celular que es más usada para su cultivo es la de células promielocíticas leucémicas HL-60. Para realizar el cultivo se debe tomar la muestra de sangre en la fase aguda de la infección, ya que es el momento en el cual hay mayor bacteremia.

La muestra ya sea de sangre fresca o la capa leucocitaria, debe ser transportada en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y preservada a temperatura ambiente no más de 48 horas o bien ser congelada a -20°C . Posteriormente, se inocula la capa leucocitaria en la capa de la línea celular HL-60, luego se incuban las células a 37°C y dos veces por semana se les agrega mas medio de cultivo fresco. Un resultado positivo puede observarse entre los tres y siete días luego de la incubación y se comprueba observando las mórulas teñidas con tinción de Giemsa o Wright (Oteo & Brouqui, 2005; Anda et al., 2007).

1.7 Prevención, control y tratamiento

Para prevenir y controlar las infecciones con estos agentes, el único método que se encuentra disponible, es el control de los vectores (Greene, 2012; Dolz et al., 2013). Se recomienda realizar un buen control de ectoparásitos sobre los animales y eventualmente fumigaciones en el medio ambiente en el que se desenvuelven, para evitar la infestación por garrapatas y así la posible infección con los agentes (Greene, 2012).

El tratamiento recomendado para las anaplasmosis son fármacos derivados de las tetraciclinas y enrofloxacinas (Parola, 2007; Forbes et al., 2009; Bowman, 2009; Greene, 2012). El más utilizado en caninos es la doxiciclina, que se administra de 5 a 10 mg/kg oral cada 12 – 24 horas. Los tratamientos, para que logren tener efectividad, deben de darse por periodos largos, cerca de 21 días, ya que se ha visto, que si se acorta el periodo de tratamiento, puede establecerse una infección persistente en el paciente, y posteriormente podría volver a desarrollar la enfermedad (Taylor et al., 2007; Ettinger & Feldman, 2010; Greene, 2012).

1.8 Justificación e importancia

En estudios anteriores se ha logrado determinar la presencia de los agentes (*A. phagocytophilum* y *A. platys*) en muestras de sangre y garrapatas de perros con sintomatología sospechosa de sufrir ehrlichiosis y anaplasmosis; sin embargo, se desconoce la prevalencia de estos agentes en la población canina sana de Costa Rica, especialmente la población de perros que visitan parques públicos.

A. phagocytophilum es un agente zoonótico que, hasta el momento, se ha encontrado en sangre de un venado cola blanca, tres perros y dos garrapatas *R. sanguineus* de Costa Rica. Además, no se descarta una posible infección con anaplasmas en cuatro casos de humanos entre los años 2007 y 2010 en diferentes hospitales de Costa Rica.

A. phagocytophilum podría representar un riesgo en la salud de las personas que visitan parques públicos de Costa Rica, al entrar en contacto con garrapatas que se han alimentado de perros infectados. Por consiguiente, es importante determinar la presencia de este agente en sangre y garrapatas de perros que visitan los parques públicos de Costa Rica e identificar el posible peligro que tienen los perros y humanos que visitan los parques públicos de contraer anaplasmosis.

Con este estudio se pretende obtener datos reales de la presencia de *A. phagocytophilum* y *A. platys* en perros y garrapatas de Costa Rica, además, determinar la cantidad de animales que presentan infecciones activas o exposición pasada a los agentes, para así poder identificar el posible peligro que tendrían los perros de infectarse con estos agentes al visitar los parques públicos del país.

1.9 Hipótesis

H₀: La seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en perros que visitan parques públicos de Costa Rica es mayor a 10%.

H₀: La infección con *A. phagocytophilum* y *A. platys* de perros que visitan los parques públicos de Costa Rica por PCR en sangre es mayor a 10%.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

Establecer la prevalencia de anticuerpos y antígenos de *A. phagocytophilum* y antígenos de *A. platys* en sangre y garrapatas de perros que visitan parques públicos en Costa Rica.

1.10.2 Objetivos específicos

- Tasar la seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en perros que visitan parques públicos en Costa Rica.
- Estimar la prevalencia de *A. phagocytophilum* en sangre y garrapatas de perros que visitan parques públicos en Costa Rica.
- Estimar la prevalencia de *A. platys* en sangre y garrapatas de perros que visitan parques públicos en Costa Rica.
- Determinar el porcentaje de infecciones pasadas y activas de *A. phagocytophilum* y *A. platys*, por medio de la técnica de PCR e Inmunofluorescencia, respectivamente.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo observacional, transversal y descriptivo, con el cual se determinó la seroprevalencia de *A. phagocytophilum* y la prevalencia de *A. phagocytophilum* y *A. platys*, mediante técnicas serológicas y moleculares, en las muestras de suero, sangre y garrapatas de los perros que visitan parques públicos.

2.2 Procedencia, tipo y tamaño de la muestra

Las muestras que se utilizaron para este estudio procedían de un banco de sueros, sangres y garrapatas de perros que visitaron quince parques públicos de Costa Rica durante los años 2011 y 2012. Las muestras se encontraban en el Laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional y fueron recolectadas en el marco del proyecto “Diagnóstico molecular de agentes infecciosos en garrapatas y de animales domésticos de distintas áreas recreativas de Costa Rica”, con el objetivo de detectar agentes transmitidos por ectoparásitos.

Las muestras fueron recolectadas en diferentes parques públicos en todas las provincias del país (Cuadro 1). El criterio de selección para realizar la investigación en todas las provincias del país, fue el hecho de que se había identificado *Anaplasma* spp. En algunas provincias (Ábrego, 2008; Campos, 2011; Rojas et al., 2014), y que al abarcar todo el territorio nacional, se estimaría la prevalencia de estos agentes en el país. Se visitó parques públicos con altos niveles de concurrencia, solo una vez y en los fines de semana, por ser los días en que son más visitados.

Se muestrearon los perros de los propietarios que estaban anuentes a participar en el proyecto. Se les realizó una entrevista a los dueños y una revisión clínica a los animales (Anexo 1). Se recolectó muestras de sangre completa con y sin anticoagulante, y garrapatas de los perros, sin importar la edad, sexo, raza o estatus clínico.

El tamaño de la muestra, que se requirió para este estudio fue de 300 animales, lo cual fue calculado por medio del programa WinEpiScope 2.0, con una prevalencia estimada del 6% (Ábrego, 2008; Campos, 2011) para *A. phagocytophilum* y *A. platys*, además un nivel de confianza del 95%, basándose en una población total de 1 939 142 perros en el país, ya que estudios determinaron que en cada vivienda existían en promedio 1.6 perros, y para el 2011 había un total de 1 211 964 viviendas ocupadas en Costa Rica, de las cuales se encontraban el 33.1% en San José, 19.5% en Alajuela, 10.8% en Cartago, 10.1% en Heredia, 9.8% en Puntarenas, 9.0% en Limón y 7.6% en Guanacaste (List, 2009; Fuprovi, 2012; INEC, 2012; Sociedad Mundial para la Protección Animal, 2012).

Finalmente se analizaron 408 sueros en IFI para *A. phagocytophilum*, 374 sangres de perros y 120 grupos de garrapatas (624 garrapatas en total) en PCR para *A. phagocytophilum* y *A. platys*, de los perros que visitaron los parques públicos del país (Cuadro 1).

Todas las garrapatas de cada perro se clasificaron por especie, sexo y estadio. Luego se guardaron en tubos Eppendorf a -20°C hasta realizarles la extracción de ADN. De los 120 perros a los cuales se les recolectaron garrapatas en este estudio, se logró realizar la extracción de ADN a 122 grupos de garrapatas. Ciento doce perros tenían solo *R. sanguineus*, cuatro perros tenían solo *Amblyomma ovale*, un perro tenía solo *Amblyomma cajennense*, un perro tenía solo *Ixodes boliviensis* y dos perros tenían infecciones mixtas, uno de ellos tenía *R. sanguineus* y *A. ovale*, y el otro tenía *R. sanguineus* y *A. cajennense*.

Cuadro 1. Tipo y número de muestras analizadas por parque público.

Parque	Provincia	Número de muestras analizadas		
		Sueros caninos n (%)	ADN Sangre canina n (%)	Grupos Garrapatas de perros n (%)
Parque Metropolitano La Sabana	San José	52 (12.7%)	44 (11.8%)	11 (9.2%)
Parque de Barrio México	San José	16 (4%)	16 (4.3%)	4 (3.3%)
Parque de La Paz	San José	32 (7.8%)	29 (7.7%)	4 (3.3%)
Parque Central de Desamparados	San José	31 (7.6%)	31 (8.3%)	7 (5.8%)
Parque Central de Aserri	San José	25 (6.1%)	25 (6.7%)	0 (0%)
Parque Central de Ciudad Colón	San José	23 (5.6%)	18 (4.8%)	8 (6.7%)
Parque del Agricultor	Alajuela	23 (5.6%)	22 (5.9%)	8 (6.7%)
Parque Central de La Fortuna	Alajuela	18 (4.4%)	16 (4.3%)	7 (5.8%)
Parque Monte de la Cruz	Heredia	27 (6.6%)	26 (6.9%)	2 (1.7%)
Centro Recreativo del ITCR	Cartago	35 (8.6%)	34 (9.1%)	5 (4.2%)
Parque Vargas	Limón	4 (1%)	3 (0.8%)	1 (0.8%)
Parque Asís Esna	Limón	24 (5.9%)	24 (6.4%)	13 (10.8%)
Parque Central de Guápiles	Limón	26 (6.4%)	18 (4.8%)	10 (8.3%)
Parque Central de Cañas	Guanacaste	42 (10.3%)	41 (11%)	26 (21.7%)
Parque Central de Quebrada Ganado	Puntarenas	30 (7.4%)	27 (7.2%)	14 (11.7%)
TOTAL		408	374	120

2.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Se utilizó el kit comercial de inmunofluorescencia indirecta “*E. canis* and *A. phagocytophilum* MIF Canine IgG Antibody Kit” de Fuller Laboratories®, California, EEUU. Se preparó una dilución de 1:80 de cada suero a analizar en Buffer Fosfato Salino (PBS), pH 7.2, luego se agregó 10 µl de cada suero diluido a cada pocito de la lámina (Figura 1). Se incluyó en cada lámina un control positivo y un control negativo, se incubó por 30 minutos a 37°C, se lavó la lámina tres veces con PBS y se agregó una gota del conjugado (anticanino IgG - fluoresceína) a cada pocito. Se incubó en una cámara oscura por 30 minutos a 37°C, luego se lavó de nuevo tres veces con PBS, por último se agregó de dos a tres gotas del medio de montaje, se puso el cubreobjetos y se llevó al microscopio de inmunofluorescencia para leer los resultados. Un suero se determinó como positivo, si presentó fluorescencia en una dilución 1:80.



Figura 1. Adición de 10 µl de cada suero diluido a cada pocito de la lámina de IFI.

2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.4.1 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de las muestras de sangre de perro se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Catálogo No. A1120). Las extracciones se realizaron según el protocolo recomendado por los fabricantes. Para la extracción del ADN de los grupos de garrapatas se utilizó el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit de Qiagen®. Las extracciones se realizaron según el protocolo recomendado por los fabricantes.

2.4.2 La PCR convencional para *A. phagocytophilum*

La PCR que se utilizó para detectar la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* en las muestras de sangre y garrapatas fue anidado, amplificando un segmento del gen 16SrARN. Se utilizó como control positivo ADN de *A. phagocytophilum* donado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta en EE.UU y como control negativo agua grado biología molecular (Scientific). En la primer ronda se utilizó 1 µl de ADN de la muestra de sangre o garrapata, 6.25 µl DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (Scientific), 0.5 µl del iniciador ge3a (10 µM), 0.5 µl del iniciador ge10r (10 µM) y 4.25 µl de agua grado biología molecular (Scientific) para cada muestra. Las condiciones de la primera ronda en el termociclador fueron de dos minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 55°C, un minuto de extensión a 72°C y cinco minutos de extensión final a 72°C.

En la segunda ronda se utilizó 1 µl del producto de la primera ronda, 6.25µl DreamTaqTM PCR Master Mix 2X (Scientific), 0.5 µl del iniciador ge9f (10 µM), 0.5 µl del iniciador ge2 (10 µM) y 4.25 µl de agua grado biología molecular (Scientific) para cada muestra. Las condiciones de la segunda ronda en el termociclador fueron de dos minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 55°C, un minuto de extensión a 72°C y cinco minutos de extensión final a 72°C.

Se realizó la electroforesis de todos los productos de la segunda ronda en geles de agarosa al 2%, utilizando GelRed para teñir el ADN, y se corrieron en la cámara de electroforesis a 100 voltios de 30 a 40 minutos. Las bandas que mostraron un peso molecular de 546 pb fueron consideradas como positivas para *A. phagocytophilum*.

2.4.3 La PCR convencional para *A. platys*

La PCR que se utilizó para detectar la presencia de ADN de *A. platys* en las muestras de sangre y garrapatas también fue anidado, por lo que se realizaron dos rondas para la amplificación del segmento del gen 16SrARN, que se esperaba encontrar. Se utilizó como control positivo ADN de *A. platys* de una muestra de perro que fue previamente confirmada como positiva mediante secuenciación. Como control negativo se utilizó agua grado biología molecular (Scientific). En la primer ronda se utilizó 1 µl del ADN de las muestras de sangre o garrapatas, 6.25 µl del DreamTaqTM PCR Master Mix 2X (Scientific), 0.5 µl del iniciador 8F (10 µM), 0.5 µl del iniciador 1448R (10 µM) y 4.25 µl de agua grado biología molecular (Scientific).

Las condiciones de la primera ronda en el termociclador fueron de dos minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 40 ciclos de un minuto de desnaturalización a 94°C, un minuto de alineamiento a 45°C, dos minutos de extensión a 72°C y 5 minutos de extensión final a 72°C. En la segunda ronda se utilizó 1 µl del producto de la primera ronda, 6.25µl del DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (Scientific), 0.5 µl del iniciador EHR16SR (10 µM), 0.5 µl del iniciador PLATYS (10 µM) y 4.25µl de agua grado biología molecular (Scientific). Las condiciones de la segunda ronda en el termociclador fueron de un minuto de desnaturalización inicial a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 55°C, 30 segundos de extensión a 72°C y cinco minutos de extensión final a 72°C.

Se realizó la electroforesis de todos los productos de la segunda ronda en geles de agarosa al 2%, utilizando GelRed para teñir el ADN y se corrieron en la cámara de electroforesis a 100 voltios de 30 a 40 minutos. Las bandas que mostraron un peso molecular de 678 pb fueron consideradas como positivas para *A. platys*.

2.5 Secuenciación

Todas las muestras que resultaron positivas en la PCR para *A. phagocytophilum* y *A. platys* fueron enviadas para ser purificadas y secuenciadas por la empresa Macrogen en Seoul, Corea del Sur. Las secuencias parciales obtenidas, se alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y se compararon mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología (NCBI).

2.6 Análisis estadístico

Se calculó la seroprevalencia de *A. phagocytophilum*. Se determinó el número de muestras positivas en PCR para *A. phagocytophilum* y para *A. platys*. Se determinó como infecciones pasadas, aquellos perros cuyas muestras de sangre resultaron positivas en IFI y negativas en PCR. Se determinó como infecciones activas, aquellos perros cuyas muestras de sangre resultaron positivas en PCR, independientemente del resultado en IFI. Se realizó un análisis descriptivo de todas las muestras seropositivas y las muestras PCR positivas para alguno de los agentes, tanto las muestras de sangre, como las muestras de garrapatas de los perros.

Prevalencia serológica de *A. phagocytophilum*:
$$\frac{\# \text{ animales positivos} \times 100}{\text{total de animales muestreados}}$$

3 RESULTADOS

3.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para *A. phagocytophilum*

De un total de 408 perros analizados mediante IFI, 11 (2.7%) resultaron positivos y 397 (97.3%) negativos (Figura 2).

De los once perros positivos en la IFI, cinco (45.4%) provenían de San José, dos (18.2%) de Guanacaste, dos (18.2%) de Heredia, uno (9.1%) de Limón y uno (9.1%) de Puntarenas (Cuadro 2). Un total de ocho perros (72.7%) fueron sin raza definida, siete eran hembras (63.6%) y ocho (72.7%) se encontraban entre los primeros tres años de vida. Solamente tres perros (27.3%) no poseían dueños y se encontraban deambulando en el parque, seis perros (54.5%) se mantenían afuera de la casa del dueño, además seis (54.5%) mostraron condición corporal regular, y en siete de los perros (63.6%) se reportó garrapatas alguna vez en su vida, aunque en el momento de la toma de muestra solo en dos perros (18.2%) se encontró garrapatas de la especie *R. sanguineus* sobre ellos (Cuadro 2).

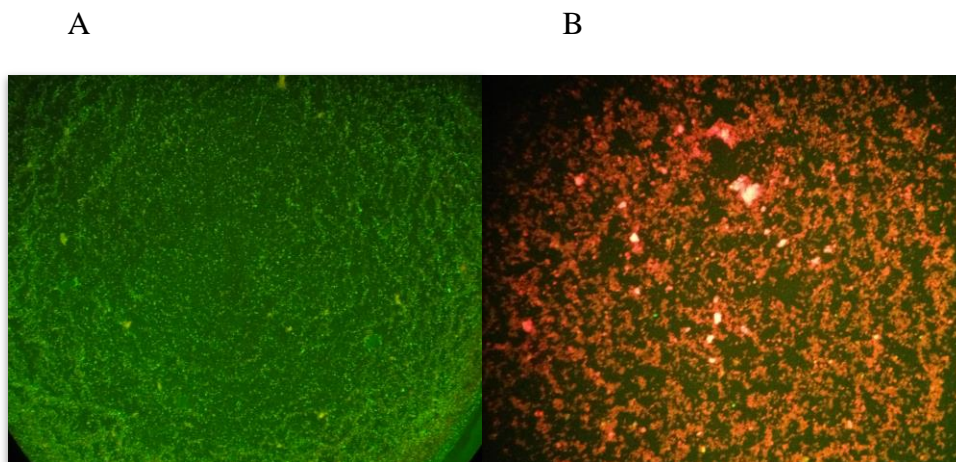


Figura 2. Reacción positiva (A) y negativa (B) de sueros caninos en la IFI de *A. phagocytophilum*.

Cuadro 2. Características de los 11 perros seropositivos para *A. phagocytophilum*.

Código Perro	Provincia	Parque	Raza	Sexo	Edad Años	Propietario	Dónde permanece	Cond. Corporal	Historia Garrapatas	Presencia Garrapatas	Tratamiento Doxiciclina
A3	San José	Metropolitano La Sabana	Bull Terrier Inglés	Macho	1	Sí	Adentro	Buena	Sí	0	No
C37	San José	Central de Desamparados	Golden Retriever	Macho	8	Sí	Adentro	Buena	Sí	0	No
C89	San José	Barrio México	SRD	Hembra	1	No	Afuera	Regular	No hay datos	0	No
C94	San José	Barrio México	SRD	Macho	10	No	Afuera	Regular	No hay datos	0	No
C318	San José	Central de Ciudad Colón	Golden Retriever	Hembra	3	Sí	Ambos	Buena	Sí	0	No
C124	Guanacaste	Central de Cañas	SRD	Hembra	2	Sí	Ambos	Regular	Sí	0	No
C135	Guanacaste	Central de Cañas	SRD	Hembra	2	Sí	Afuera	Regular	No	0	No
C194	Heredia	Monte de la Cruz	SRD	Hembra	2	Sí	Afuera	Buena	Sí	0	No
C196	Heredia	Monte de la Cruz	SRD	Hembra	2	Sí	Afuera	Regular	Sí	0	No
C280	Limón	Central de Guápiles	SRD	Hembra	12	Sí	Ambos	Obesa	Sí	1	No
C323	Puntarenas	Central de Quebrada Ganado	SRD	Macho	1	No	Afuera	Regular	No hay datos	11	No

SRD= Sin raza definida.

De los 11 perros que presentaron un resultado seropositivo para *A. phagocytophilum*, nueve (81.8%) presentaron algún valor hematológico alterado (Cuadro 3). Los eosinófilos fueron las células en las que más perros obtuvieron un resultado mayor al referencial, seis (54.5%) presentaron eosinofilia.

Cuadro 3. Valores hematológicos de los 11 perros seropositivos para *A. phagocytophilum*.

Código Perro	Parámetro	Ht	Hg g/dl	CHCM	Leucocitos	Bandas	Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas
	Rango Referencial	36-47	11-16	32-36	6 000-12 000	0-300	3 000-9 000	100-750	0-10	1 000-4 800	60-840	200 000-500 000
A3		51	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C37		46	16	34	9900	99	6435	594	0	1980	792	ND
C89		41	14	34	9050	0	4978	1539	0	2444	91	270846
C94		34	11	32	20400	0	8364	612	0	11016	408	274516
C318		45	15	33	5350	0	3264	0	0	2033	54	198180
C124		35	11	31	23600	472	11800	5900	0	4956	472	ND
C135		35	15	42	9050	362	3982	1810	91	2353	453	ND
C194		45	15	33	20100	0	8241	5628	402	5427	402	165150
C196		46	15	33	17300	346	10726	865	0	5017	346	337640
C280		49	17	34	6150	0	3629	308	0	2214	0	395626
C323		30	9	30	9800	490	6174	1078	0	1862	196	88080

Ht= Hematocrito, Hg= Hemoglobina en gramos por decilitro, CHCM= Concentración de hemoglobina corpuscular media y ND= No determinado.

3.2 Resultados de la PCR convencional para *A. phagocytophilum*

De un total de 374 muestras de sangre analizadas en la PCR para detectar *A. phagocytophilum*, un (0.3%) perro que provenía de Guanacaste, del Parque Central de Cañas, resultó positivo (Figura 3). Se trató de una hembra sin raza definida, aproximadamente de 10 años de edad y callejera, que deambulaba en el parque. Al no tener dueño, no se pudo recolectar información del animal, sin embargo presentó buena condición física, membranas rosadas en el examen clínico y no presentó signos clínicos compatibles con anaplasmosis. A la hora de la toma de muestra no se encontraron garrapatas sobre ella. A la muestra de sangre no se le pudo realizar el hemograma.

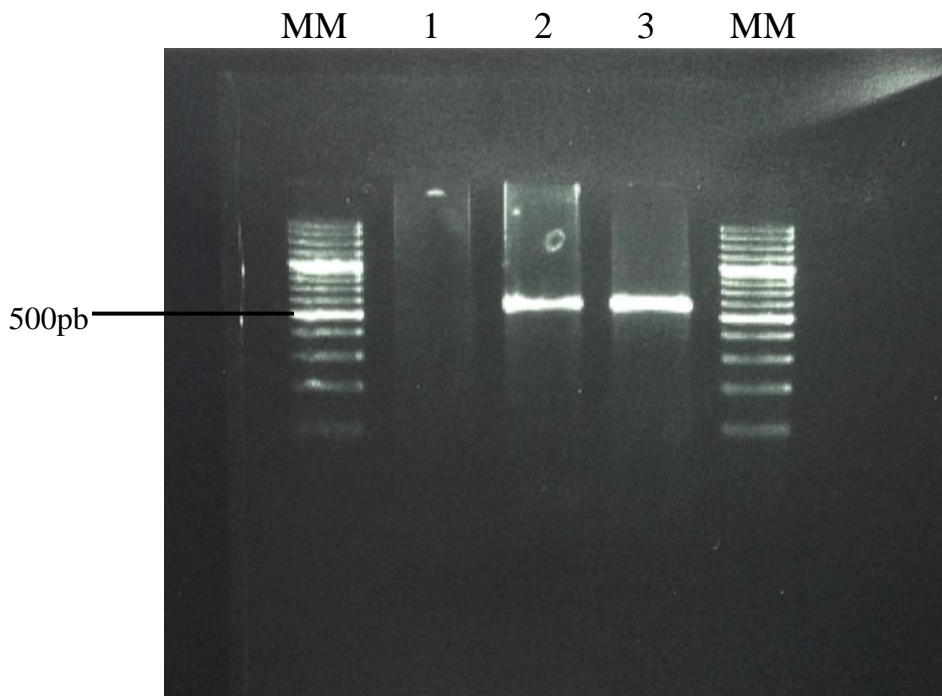


Figura 3. Electroforesis de gel de agarosa de una muestra de sangre positiva en la PCR de *A. phagocytophilum*. MM: Marcador de peso molecular, 1: Control negativo, 2: Control positivo, 3: Muestra de sangre (C160) positiva para *A. phagocytophilum*.

De un total de 122 grupos de garrapatas, pertenecientes a 120 perros, un grupo de garrapatas *R. sanguineus* (0.8%) resultó positivo. El perro al cual perteneció el grupo de garrapatas *R. sanguineus* positivo en la PCR de *A. phagocytophilum* provenía de la provincia de San José (Parque de La Paz) y se encontró sobre un perro Pequinés, macho, de cinco años, el cual tenía una apariencia saludable, presentaba una buena condición corporal y membranas mucosas rosadas. Según su dueño, el perro era mantenido dentro de la casa, había tenido garrapatas alguna vez en su vida y no había sido tratado nunca con doxiciclina. En el momento en que se hizo la toma de muestras, se encontraron cuatro garrapatas *R. sanguineus*. La sangre de este perro resultó negativa en la IFI y PCR para *A. phagocytophilum*, también resultó negativo para la PCR de *A. platys*. Los valores hematológicos del perro, al cual perteneció el grupo de garrapatas *R. sanguineus* positivas, se mostraron dentro del rango referencial, sin embargo la CHCM (31) se encontraba levemente disminuida y el número de bandas (354) levemente aumentado.

3.3 Resultados de la PCR convencional para *A. platys*

De un total de 374 muestras de sangre analizadas en la PCR para *A. platys*, cuatro perros (1%) resultaron positivos (Figura 4). Dos perros provenían de Guanacaste, del Parque Central de Cañas, y los otros dos provenían de Puntarenas, del Parque Central de Quebrada Ganado. Todos los perros eran menores de tres años, tres perros presentaron una condición corporal buena, tres presentaron garrapatas en el momento de la toma de muestra y dos presentaron mucosas pálidas o muy pálidas y reportaron historia de haber tenido garrapatas en algún momento de su vida, además los propietarios reportaron que los perros no habían recibido tratamiento con doxiciclina (Cuadro 4).

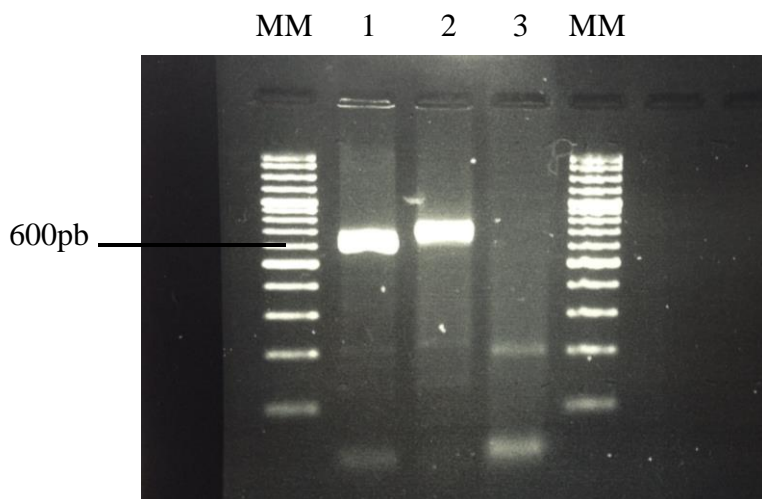


Figura 4. Electroforesis de gel de agarosa de una muestra de sangre positiva en la PCR de *A. platys*. MM: Marcador de peso molecular, 1: Control positivo, 2: Muestra de sangre (C140) positiva para la PCR de *A. platys*, 3: Control negativo.

Todos los perros que presentaron un resultado positivo en PCR de *A. platys* mostraron algún valor hematológico alterado. Todas mostraron niveles más bajos de hemoglobina, tres perros presentaron valores de hematocrito y plaquetas bajos y tres presentaron un número de eosinófilos más elevado (Cuadro 5).

Cuadro 4. Características de los cuatro perros positivos en la PCR de *A. platys*.

Código Perro	Provincia	Parque	Raza	Sexo	Edad Años	Propietario	Dónde Permance	Cond Corporal	Historia Garrapatas	Presencia Garrapatas	Membrana Mucosa	Tratamiento Doxiciclina
C126	Guanacaste	Central de Cañas	SRD	Hembra	0.5	Sí	Ambos	Buena	Sí	0	Muy pálida	No
C140	Guanacaste	Central de Cañas	Pinscher miniatura	Hembra	3	Sí	Afuera	Buena	No	2	Rosada	No
C329	Puntarenas	Central de Quebrada Ganado	Pastor Alemán	Hembra	0.6	Sí	Adentro	Buena	No	1	Rosada	No
C346	Puntarenas	Central de Quebrada Ganado	SRD	Hembra	2	Sí	Adentro	Regular	Sí	1	Pálida	No

SRD= Sin raza definida.

Cuadro 5. Valores hematológicos de los cuatro perros positivos para la PCR de *A. platys*.

Código Perro	Parámetro	Ht	Hg g/dl	CHCM	Leucocitos	Bandas	Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas
	Rango Referencial	36-47	11-16	32-36	6000-12000	0-300	3000-9000	100-750	0-10	1000-4800	60-840	200 000 - 500 000
C126		34	10	29	8900	178	3738	979	0	3560	445	24956
C140		31	9	30	7950	398	5963	477	0	636	477	136524
C329		37	10	28	20200	202	10302	6060	0	3636	0	217264
C346		31	10	32	15000	300	10350	900	0	3300	150	56885

Ht= Hematocrito, Hg= Hemoglobina en gramos por decilitro, CHCM= Concentración de hemoglobina corpuscular media y ND= No determinado.

Se analizaron en total 122 grupos de garrapatas, pertenecientes a 120 perros. Estas garrapatas se encontraban en el perro a la hora de la toma de las muestras. De los 122 grupos de garrapatas de diferentes especies y estadios, pertenecientes a 120 perros, ninguno de los grupos resultó positivo en la PCR de *A. platys*.

3.4 Secuenciación de las muestras positivas de *A. phagocytophilum* y *A. platys*

Las dos muestras positivas en la PCR para *A. phagocytophilum* (sangre y grupo de garrapatas *R. sanguineus*), mostraron un 100% (527/527pb) de identidad nucleotídica con la secuencia del genoma completo de *A. phagocytophilum*, aislada de un perro y depositada en el GenBank (CP006618.1) (Anexo 2).

En cuanto a los resultados de secuenciación de las cuatro muestras positivas en la PCR para *A. platys*, dos muestras (C140 y C346) mostraron un 100% (695/695pb) de identidad nucleotídica y otras dos muestras (C126 y C329) un 99.85% (694/695pb) con la secuencia parcial de *A. platys* (JQ894779.2) detectado en un perro de Filipinas (Ybanez et al., 2012). La diferencia en el porcentaje de identidad nucleotídica entre estas secuencias se debió a una sustitución en la posición número 267 en el nucleótido A por una C (Anexo 3). Así mismo las secuencias de las muestras C126 y C329 mostraron un 100% de identidad nucleotídica con la secuencia parcial de una muestra de sangre de perro positiva para *A. platys*, reportada por Ábrego, 2008.

3.5 Infecciones pasadas y activas de *A. phagocytophilum* y *A. platys*

Se determinaron como infecciones pasadas las 11 muestras positivas en la IFI de *A. phagocytophilum* (2.7%), ya que estas resultaron negativas en la PCR de *A. phagocytophilum* y *A. platys*. De estos once perros, dos tenían garrapatas *R. sanguineus*, a las cuales se les realizó PCR de *A. phagocytophilum* y *A. platys*, resultando negativas.

Se estableció como muestra con infección activa de *A. phagocytophilum* solo una muestra de sangre (0.3%) de las 374 muestras procesadas. Esta muestra obtuvo un resultado negativo en la PCR de *A. platys* y en la IFI de *A. phagocytophilum*. En este perro no se encontraron garrapatas en el momento de la toma de muestras.

Se determinó como muestras con infección activa de *A. platys*, las cuatro muestras de sangre (1%) de las 374 muestras procesadas, que obtuvieron un resultado positivo en la PCR para *A. platys*. Todas resultaron negativas en las pruebas de IFI y PCR de *A. phagocytophilum*. Además, tres de estos cuatro perros positivos presentaron garrapatas en el momento de la toma de la muestra, pero solo a dos perros se les pudo analizar las garrapatas *R. sanguineus*, las cuales resultaron negativas en la PCR para *A. phagocytophilum* y *A. platys*.

Un grupo de garrapatas *R. sanguineus* resultó positivo en la PCR para *A. phagocytophilum*, a este grupo se le realizó la PCR para *A. platys* y resultó negativo. Al perro al cual pertenecía este grupo de garrapatas positivo en *A. phagocytophilum*, resultó negativo tanto en la IFI de *A. phagocytophilum* como en la PCR para *A. phagocytophilum* y *A. platys*.

4 DISCUSIÓN

Este estudio reporta por primera vez la seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en perros que visitan parques públicos de Costa Rica. De 408 perros analizados, 11 obtuvieron un resultado positivo, determinándose así una seroprevalencia del 2.7% en la población canina de Costa Rica. La presencia de anticuerpos contra este agente era esperado, ya que había sido reportado tanto en Norte como en Suramérica (Arraga-Alvarado, 1994; Oteo & Brouqui, 2005; Anda et al., 2007; López et al., 2007; Greene, 2012). Además, en el 2010, Soto detectó por primera vez el agente en Costa Rica, en una muestra de sangre de un venado cola blanca proveniente de San Carlos, el cual se considera, entre otros, reservorio de *A. phagocytophilum*. El resultado de un 2.7% de seroprevalencia también era esperado, ya que en un estudio realizado en el 2011 con perros sospechosos de sufrir ehrlichiosis y anaplasmosis, se determinó un 1% de prevalencia del agente por medio de PCR en esa población canina de Costa Rica (Campos, 2011). Un factor que hay que considerar, es que animales con resultados positivos en pruebas serológicas, podrían no tener el agente en ese momento, ya que en el caso de las anaplasmas los anticuerpos pueden persistir circulando alrededor de ocho meses luego de eliminada la bacteria (De la Fuente et al., 2006; Taylor et al., 2007; Greene, 2012).

Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que los 11 perros que presentaron anticuerpos contra *A. phagocytophilum* se determinaron con infección pasada, y nunca habían sido tratados con doxiciclina, por lo que se puede concluir, que los perros resolvieron la enfermedad por sí solos y ésta además se presentó en forma subclínica, ya que los dueños nunca sospecharon ni reportaron signos clínicos compatibles con anaplasmosis, lo cual concuerda con la literatura, en la que se ha visto, que la mayoría de los animales muestran muy pocos o ningún signo clínico cuando se encuentran infectados (Lillini et al., 2006; Stuen, 2007; Greene, 2012).

Otro factor que hay que considerar, es la posibilidad de que alguno de los resultados de los perros seropositivos, pudieran deberse a una reacción cruzada con *A. platys*, ya que se ha reportado, que estos dos agentes podrían mostrar reacción cruzada en las pruebas serológicas (De la Fuente et al., 2006; Taylor et al., 2007; Greene, 2012), y los dos agentes se encuentran presentes en el país, siendo *A. platys*, el que se ha encontrado en mayor porcentaje en este y otros estudios (Ábrego, 2008).

En los resultados de los exámenes laboratoriales de los perros seropositivos, cuatro tenían una leve anemia, otros cuatro presentaron leucocitosis y linfocitosis, seis de los perros eosinofilia y tres trombocitopenia, estos signos son algunas de las patologías más comunes en los exámenes laboratoriales, que se reportan en perros que tienen una infección con *A. phagocytophilum* (Lillini et al., 2006; Rikihisa, 2011; Greene, 2012), lo que podría indicar, que en algún momento fueron infectados, que lograron resolver la infección y que posiblemente se encuentran en un proceso de recuperación.

En este estudio se determinó con infección activa de *A. phagocytophilum* a una única muestra, obteniéndose un 0.3% de infección activa en perros que visitan parques públicos de Costa Rica. Este valor era el esperado, ya que en el estudio de Campos (2011) se reportó un 0.9% de infección en perros sospechosos de sufrir ehrlichiosis y anaplasmosis, los perros determinados como positivos por Campos (2011) provenían de Jacó y Heredia. En el presente estudio, el perro que presentaba infección activa de *A. phagocytophilum* provenía del Parque Central de Cañas, Guanacaste, y deambulaba en el mismo. Este es el primer reporte de la presencia de *A. phagocytophilum* en perros de Cañas, en donde se encontró además, dos perros con anticuerpos contra *A. phagocytophilum*. Al no contar con dueño y no poder realizarle el hemograma al perro positivo, no se pudo obtener mucha información de su estado de salud, aunque en el examen clínico el perro se encontró con una buena condición física, membranas mucosas rosadas y no mostraba signos clínicos compatibles con anaplasmosis. Esto concuerda con la literatura, en donde se reporta que la mayoría de los animales muestran muy pocos o ningún signo clínico, cuando se encuentran infectados con *A. phagocytophilum* (Lillini et al., 2006; Stuen, 2007; Greene, 2012).

No se le encontraron ectoparásitos a la hora de la toma de muestra, por lo que no se pudo analizar los mismos, para determinar si estos poseían el agente. Además, este perro resultó negativo en la prueba de IFI de *A. phagocytophilum* y en la PCR de *A. platys*. Esto indica que la infección con *A. phagocytophilum* fue reciente, ya que el tiempo de aparición de los anticuerpos se da aproximadamente ocho días post infección, por lo que el perro podría haberse encontrado en el periodo de incubación (8 – 15 días p.i) por lo cual podrían no encontrarse los anticuerpos (De la Fuente et al., 2006; Taylor et al., 2007; Carrada et al., 2009; Greene, 2012).

Hay que recalcar que este perro representa un foco de infección y propagación de *A. phagocytophilum*, ya que éste permanece en ese parque y no cuenta con atención veterinaria ni control de ectoparásitos.

De los 122 grupos de garrapatas analizados, solamente resultó positivo para *A. phagocytophilum* un grupo de garrapatas *R. sanguineus* (0.8%), de un perro del Parque de la Paz, San José. Campos (2011), reportó dos garrapatas *R. sanguineus* (1.25%) de 160 analizadas como positivas para *A. phagocytophilum*, lo que es muy similar a lo reportado en este estudio. Aunque en la literatura se reporta el género *Ixodes* spp. como el vector más común de *A. phagocytophilum*, hay estudios en los que se está reportando *R. sanguineus* como otro posible vector (Stuen, 2007). El obtener un resultado positivo en la PCR para *A. phagocytophilum* en garrapatas *R. sanguineus* de Costa Rica era esperado, ya que Campos (2011) reportó la presencia de este agente en *R. sanguineus* de perros enfermos. Se recomienda realizar más estudios sobre la transmisión de *A. phagocytophilum* y sus posibles vectores en Costa Rica. El perro, al cual pertenecía este grupo de garrapatas *R. sanguineus* fue un macho pequinés de cinco años, el cual permanecía, según sus dueños, siempre dentro de la casa. Este resultado es muy importante, ya que demuestra, que podría ocurrir la transmisión de *A. phagocytophilum* por garrapatas de perros que conviven con humanos.

El perro al cual pertenecía el grupo de garrapatas positivas para *A. phagocytophilum* no presentó sintomatología compatible con anaplasmosis en el momento de la toma de muestras, se encontraba con buena condición corporal y una apariencia saludable. En los exámenes de laboratorio tampoco se encontró algún resultado relevante o patología compatible con anaplasmosis, por lo que se sospecha que la garrapata no había infectado aún al perro al momento de la toma de la muestra, ya que las garrapatas necesitan entre 24 a 48 horas para alimentarse y poder transmitir el agente a los hospedadores (Taylor et al., 2007; Carrade et al., 2009; Ettinger & Feldman, 2010).

Otra posibilidad es, que *R. sanguineus* no sea vector y no pueda transmitir *A. phagocytophilum*, por lo que se recomienda hacer más estudios sobre la posibilidad de que *R. sanguineus* sea un vector efectivo de este agente.

En este estudio se determinó cuatro perros con infecciones activas de *A. platys*, los cuales resultaron negativos en la IFI y en la PCR de *A. phagocytophilum*, determinándose un 1% de prevalencia de *A. platys*. Este porcentaje es más bajo que el reportado por Ábrego (2008), que reportó un 6.33%, y el reportado por Rojas et al. (2014), que fue de un 9.6%. En el presente estudio se esperaba encontrar un porcentaje más bajo de perros infectados con *A. platys*, ya que Ábrego analizó perros sospechosos de sufrir ehrlichiosis y anaplasmosis, encontrando perros positivos para *A. platys* en todas las provincias del país, menos en Puntarenas y Limón. En el presente trabajo se encontró dos perros positivos para *A. platys* en Guanacaste y dos en Puntarenas, esto coincide con Ábrego (2008), que encontró perros positivos en Guanacaste, y con Rojas et al. (2014), quienes reportaron perros positivos en Guanacaste y Puntarenas.

Solamente dos perros positivos para *A. platys* presentaron mucosas pálidas o muy pálidas en el momento de la toma de muestra, y este fue el único signo clínico que se encontró en ese momento, posteriormente, en el hemograma, estos dos perros mostraron una leve anemia, niveles bajos de hemoglobina, eosinofilia y trombocitopenia. Además, en los exámenes laboratoriales se observó que otro perro, que no presentaba mucosas pálidas, tenía una leve anemia, niveles bajos de hemoglobina y trombocitopenia, así mismo, todos los perros positivos presentaban valores bajos de hemoglobina y de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y tres perros presentaron eosinofilia. La poca sintomatología que presentaron los cuatro perros positivos para *A. platys* en el momento de hacerles la evaluación clínica, concuerda con lo reportado en la literatura (Morgan et al., 2004; McGavin & Zachary, 2006; Ettinger & Feldman, 2010). Así mismo, la anemia leve, los niveles bajos de hemoglobina y CHCM, la eosinofilia y la trombocitopenia, son los hallazgos más comunes encontrados en el hemograma de perros infectados por *A. platys* (Morgan et al., 2004; De Farias-Rotondano et al., 2012; Greene, 2012). La presencia de anemia y anormalidades clínicas determinadas en perros infectados con *A. platys* en este estudio, concuerda con lo reportado por Rojas et al. (2014).

No se logró demostrar una asociación significativa con algún síntoma o resultado en los exámenes de laboratorio y la infección con *A. platys*, ya que fueron muy pocas las muestras positivas, para poder realizarles el análisis estadístico. Por el contrario, Ábrego (2008) sí logró realizar un análisis estadístico y no encontró asociación significativa con algún síntoma o resultado en los exámenes de laboratorio y la infección con *A. platys*, este resultado probablemente se debió a que las muestras fueron seleccionadas buscando animales con una infección de *E. canis*.

En el estudio de Rojas et al. (2014) se reportó una asociación significativa de la infección con *A. platys* con los síntomas de letargia, fiebre, condición corporal baja e inyección escleral, lo que concuerda con reportes en otros países (Morgan et al., 2004; De Farias-Rotondano et al., 2012; Greene, 2012).

Este estudio reporta por primera vez en Costa Rica la seroprevalencia y prevalencia de *A. phagocytophilum* y la prevalencia de *A. platys* de perros que visitan parques públicos en todas las provincias del país. El haber encontrado estos agentes, tanto en la sangre como en garrapatas de perros, es importante, porque se pudo identificar un posible riesgo para perros y humanos que visitan los parques públicos de Costa Rica, de infectarse con estos agentes al entrar en contacto con garrapatas infectadas. Además, se observó en el país la existencia de zonas con mayor cantidad de perros infectados (Puntarenas y Guanacaste), por lo que es importante realizar más estudios en estas regiones. Finalmente, se observó que los perros infectados con estos agentes por lo general no presentan o presentan muy pocos signos clínicos, lo que hace que pasen inadvertidos a los propietarios, sin embargo, en caso de presentar signos clínicos, es importante tomarlos en cuenta en los diagnósticos diferenciales.

5 CONCLUSIONES

- Se determinó una seroprevalencia de 2.7% de *A. phagocytophilum* en perros que visitan parques públicos de Costa Rica.
- Se estableció una prevalencia de 0.3% de *A. phagocytophilum* en perros que visitan parques públicos de Costa Rica.
- Se estableció una prevalencia de 1% de *A. platys* en perros que visitan parques públicos de Costa Rica.
- Se determinó una prevalencia de 0.8% de *A. phagocytophilum* y 0% de *A. platys* en garrapatas de perros que visitan parques públicos de Costa Rica.
- Se estableció un 2.7% de infecciones pasadas de *A. phagocytophilum* y un 0.3% y 1% de infecciones activas de *A. phagocytophilum* y *A. platys*, respectivamente, en perros que visitan parques públicos de Costa Rica.

6 RECOMENDACIONES

- Informar a la comunidad de médicos veterinarios y salud pública de los resultados de seroprevalencia y prevalencia de *A. phagocytophilum* en sangre de perros que visitan parques públicos de Costa Rica, y el posible peligro que tienen los perros y humanos de infectarse con este agente.
- Comunicar a los médicos veterinarios que tomen en cuenta a *A. phagocytophilum* y *A. platys*, como diagnósticos diferenciales para enfermedades que cursen con sintomatología compatible, y que utilicen técnicas moleculares para su adecuado diagnóstico, ya que se demostró, que los animales infectados con estos agentes presentan muy pocos signos clínicos, y si los perros presentan anticuerpos, no indica necesariamente que se encuentran infectados con estos agentes.
- Establecer un control adecuado de ectoparásitos en los perros y su medio ambiente, ya que se ha encontrado *A. phagocytophilum* en garrapatas *R. sanguineus*.
- Realizar más estudios sobre *A. phagocytophilum* y *A. platys*, respecto a su distribución, transmisión y sus posibles vectores en Costa Rica.
- Efectuar más estudios en las provincias de Puntarenas y Guanacaste, ya que se determinó que son las provincias en las que hay una prevalencia mayor de *A. platys*, con respecto a las demás provincias de Costa Rica.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ábrego, L. E. 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 de Maestría, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Anda, P, J.R. Blanco, I. Jado, M. Marín, J.A. Oteo, I. Pons, A. Portillo & I. Sanfeliu. 2007. Diagnostico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whipplei*. Eimc. España.
- Arraga-Alvarado, C. 1994. Ehrlichiosis Humana. Revisión. Invest. Clin. 35: 209 - 222.
- Arraga-Alvarado, C, M. Palmar, O. Parra & 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.
- Bowman, D.D. 2009. Georgis' parasitology for veterinarians. 9 ed. Saunders, U.S.
- Brenes-Valverde, D, S. Brenes Martínez, I. Quirós Rojas. 2011. Erliquiosis: Reporte de 2 casos. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica. 598: 315 – 318.
- Campos, L. 2011. Detección molecular del agente zoonótico *Anaplasma phagocytophilum* en muestras de sangre de perros y garrapatas de perros de Costa Rica In: Segundo Congreso de Investigación de la Red Centroamericana de Exbecarios del DAAD para la Investigación. 30 nov – 2 dic. León, Nicaragua.
- Cardozo, G.P, L.P. Oliveira, M.A.B. Mansur, E.V. Santos, P.G. Robert & M. Marins. 2009. Molecular characterisation of two strains of *Anaplasma platys* in Brazil. Veterinary Record. 164: 338 - 339.

- Carrade, D.D, J.E. Foley, D.L. Borjesson & J.E. Sykes. 2009. Canine Granulocytic Anaplasmosis: a review. *J. Vet. Intern. Med.* 23: 1129 – 1141.
- De Farias-Rotondano, T.E, A.M. Paiva de Almeida, E.M. Camboim-Lustosa, A. Antas-Cordeiro, E.K. Alves-Camboim, S. Santos de Azevedo, P. Paes de Andrade & M. Almeida de Melo. 2012. An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as DNA source for diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Scientific World Journal.* 2012: 1 - 6.
- De la Fuente, J, A. Torina, V. Naranjo, S. Nicosia, A. Alongi, F. La Mantia & K. M Kocan. 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research* 2: 24.
- Dolz, G, L. Ábrego, L.E. Romero, L. Campos-Calderón, L. Bouza-Mora & A.E. Jiménez-Rocha. 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Med. Costarricense* 55: 34 – 40.
- Ettinger, S & E. Feldman. 2010. *Veterinary internal medicine.* 7 ed. Elsevier. U.S
- Forbes, B.A., D. Sahn & A. Weissfeld. 2009. *Diagnóstico microbiológico.* 12 ed. Panamericana. Buenos Aires, Arg.
- FUPROVI (Fundación Promotora de Vivienda). 2012. *Situación de Vivienda y Desarrollo Urbano en Costa Rica en el 2012.* Unidad de Investigación (UNIN).
- Goddard, J. 2008. *Infectious diseases and arthropods.* 2 ed. Humana Press. U.S.

Greene, C. 2012. Infectious diseases of the dog and cat. 4 ed. Elsevier, U.S.

Gyles, C.L., J.F. Prescott, J.G. Songer & C.O. Thoen. 2010. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4 ed. Blackwell. U.S.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95 - 98.

Hernández-de Mezerville, V. & J.I. Padilla-Cuadra. 2007. Choque séptico por ehrliquiosis. Acta Med. Costarricense 49: 118 - 120.

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2012. Encuesta Nacional de Hogares, Julio 2012, Resultados Generales. Vol. 1 Año 3.

Lillini, E, G. Macri, G. Proietti & M. Scarpulla. 2006. New findings on Anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1081: 360 – 370.

List, Mónica. 2009. Situación actual de las poblaciones canicas en Costa Rica. Servicio Nacional de Salud Animal, Costa Rica. Dic. 2009.

López, J, K. Abarca, & T. Azócar. 2007. Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. Rev. Chil. Infect. 24: 189 – 193.

McGavin, M.D & J.F. Zachary. 2006. Pathologic basis of veterinary disease. 4 ed. Elsevier, U.S.

- Morgan, R, R. Bright & M. Swartout. 2004. Clínica de pequeños animales. 4 ed. Elsevier, Madrid, España.
- Mullen, G & L. Durden. 2002. Medical and veterinary entomology. Elsevier Science. U.S.
- Oteo, J.A & P. Brouqui. 2005. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.* 23: 375 - 380.
- Parola, P. 2007. Rickettsial diseases. Informa healthcare. New York, U.S.
- Paulino-Ruiz, A. 2011. Detección serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en humanos que realizan actividades veterinarias en Lima Metropolitana. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Ramsey, I. & B. Tennant. 2012. Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales. Grafos, España.
- Rikihisa, Y. 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24: 469 – 489.
- Rojas, A, D. Rojas, V.M. Montenegro, R. Gutiérrez, D. Yasur-Landau, G. Baneth. 2014. Vector – borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.* 199: 121 – 128.
- Rojas-Solano, J.R. & J. Villalobos-Vindas. 2007. Ehrlichiosis granulocitotrópica humana. *Acta Med. Costarricense* 49: 121 – 123.

Scanlan, C. 1991. Introducción a la bacteriología veterinaria. Acribia, Zaragoza, España.

Sociedad Mundial para la Protección Animal, 2012. Situación canina en los hogares de la Gran Área Metropolitana. Costa Rica. Dic. 2012.

Solano-Gallego, L, M. Trotta, L. Razia, T. Furlanello & M. Caldin. 2006. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1078: 515 - 518.

Soto, J.L. 2010. Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum* en garrapatas y venados cola blanca de Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Stuen, S. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Vet. Res. Commun. 31: 79 – 84.

Taylor, M.A, R.L. Coop & R.L. Wall. 2007. Veterinary parasitology. 3 ed. Blackwell, U.S.

Woldehiwet, Z. 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet. Parasitol. 167: 108 – 122.

Yabsley, M.J., J. McKibben, C.N. Macpherson, P.F. Cattan, N.A. Cherry, B.C. Hegarty, E.B. Breitschwerdt, T. O'Connor, R. Chandrashekar, T. Paterson, M.L. Perea, G. Ball, S. Friesen, J. Goedde, B. Henderson & W. Sylvester. 2008. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. Vet. Parasitol. 151: 279 – 285.

Ybanez, A.P, Z.O. Perez, S.R. Gabotero, R.S. Fumar, R.H.D. Ybanez, K. Matsumoto, N. Yokoyama, & H. Inokuma. 2012. First molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks from dogs in Cebu, Philippines. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Elsevier. 3: 288–293.

8 ANEXOS

Anexo 1. Información y ficha clínica realizada a cada perro que participó en este estudio.

Número de formulario:



**UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA**
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



Proyecto de Tesis

FECHA:		LUGAR DE MUESTREO:	
FORMULARIO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS GENERALES			
<p>Toda la información que usted brinde, será absolutamente confidencial y será de uso estricto médico-veterinario.</p>			
INFORMACIÓN PERSONAL DEL PROPIETARIO			
<p>Nombre del propietario:</p>			
Lugar de habitación actual:	Provincia:	Cantón:	
Número de teléfono:	Correo electrónico:		
INFORMACIÓN PERSONAL DEL PACIENTE			
<p>Nombre del paciente:</p>			
Raza:		Sexo:	Edad:
Lugar de habitación en el hogar:	Fuera de la casa <input type="checkbox"/>		Dentro de la casa <input type="checkbox"/>
Cantidad de animales con los que habita:		Cantidad de personas con los que habita:	

Detalle la clase de animales con los que habita: (1 gato, 2 perros, 1 caballo, etc)						
¿El paciente ha tenido alguno de los siguientes parásitos en el pasado?						
Garrapatas:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellas?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
Pulgas:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellas?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
Piojos:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellos?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
Intestinales:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellos?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
¿Con qué regularidad visita el parque?						
Hace años	<input type="checkbox"/>	Hace meses	<input type="checkbox"/>	Hace menos de 4 semanas	<input type="checkbox"/>	Ésta es la primera vez
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Alguna vez el paciente ha sido diagnosticado con EHRLIQUIOSIS (LA ENFERMEDAD DE LAS GARRAPATAS)?						
<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Hace cuánto tiempo?		¿Ha recibido tratamiento?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO
						¿Con qué?
¿Alguna vez su veterinario pudo tener la sospecha de que su mascota tuviera EHRLIQUIOSIS (LA ENFERMEDAD DE LAS GARRAPATAS)?						
<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Hace cuánto tiempo?		¿Recibió algún tratamiento?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO
						¿Con qué?
¿Alguna vez el paciente ha presentado los siguientes síntomas?						
Anorexia (pérdida del apetito)	<input type="checkbox"/>	Cualquier tipo de sangrado	<input type="checkbox"/>	Problemas respiratorios	<input type="checkbox"/>	
Fiebre	<input type="checkbox"/>	Manchas rojas en la piel	<input type="checkbox"/>	Sangre en la orina	<input type="checkbox"/>	
Debilidad	<input type="checkbox"/>	Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	Problemas para caminar	<input type="checkbox"/>	
Depresión	<input type="checkbox"/>	Inflamación en los testículos	<input type="checkbox"/>	Picazón	<input type="checkbox"/>	
Pérdida de pelo	<input type="checkbox"/>	Tumores o pelotas	<input type="checkbox"/>	Diarrea	<input type="checkbox"/>	

Número de ficha:

FICHA CLÍNICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DE PERROS EN PARQUES RECREATIVOS**INFORMACIÓN DE LA MUESTRA**

Números de muestras sanguíneas:	Rojos:		Morados:	
Número de muestra garrapatas:				
Número de muestra pulgas:				
Número de muestra piojos:				
Número de muestra heces:				

INFORMACIÓN GENERAL DEL PACIENTE

Color de pelaje:						
Condición corporal:	Caquexia <input type="checkbox"/>	Mala <input type="checkbox"/>	Regular <input type="checkbox"/>	Buena <input type="checkbox"/>	Obesidad <input type="checkbox"/>	
Actitud:	Deprimido <input type="checkbox"/>	Débil <input type="checkbox"/>	Dócil <input type="checkbox"/>	Alerta <input type="checkbox"/>	Agresivo <input type="checkbox"/>	
Membranas Mucosas:	Muy pálidas <input type="checkbox"/>	Pálidas <input type="checkbox"/>	Rosadas <input type="checkbox"/>	Ictéricas <input type="checkbox"/>		
Tiempo de llenado capilar:						
Temperatura:						
Indicios de:	Epistaxis <input type="checkbox"/>	Petequias <input type="checkbox"/>	Equimosis <input type="checkbox"/>	Metrorragia <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis <input type="checkbox"/>	Edema escrotal <input type="checkbox"/>
	Disnea <input type="checkbox"/>	Tos <input type="checkbox"/>	Cianosis <input type="checkbox"/>	Ataxia <input type="checkbox"/>	Hematuria <input type="checkbox"/>	Alopecia <input type="checkbox"/>
	Linfadenomegalia	Artritis <input type="checkbox"/>	Diarrea <input type="checkbox"/>			
GARRAPATAS	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO						

PULGAS <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>
PIOJOS <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>

OBSERVACIONES ADICIONALES

Anexo 2. Alineamiento de la secuencia del grupo de *R. sanguineus* (C25) positivo para *A. phagocytophilum* con la secuencia del genoma completo de *A. phagocytophilum* (CP006618.1) depositada en el GenBank.

C25	1	AAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTTCACCTTTAACTTACCGAACCGCCTACATGC	60
CP006618.1		AAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTTCACCTTTAACTTACCGAACCGCCTACATGC	1057096
C25	61	CCTTTACGCCAATAATTCCGAACAACGCTTGCCCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC	120
CP006618.1		CCTTTACGCCAATAATTCCGAACAACGCTTGCCCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC	1057156
C25	121	ACGGAGTTTGCCGGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCATTATCTTCCCTACTGAAAGAGTT	180
CP006618.1		ACGGAGTTTGCCGGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCATTATCTTCCCTACTGAAAGAGTT	1057216
C25	181	TTACAACCCTAAGGCCTTCCTCACTCACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTG	240
CP006618.1		TTACAACCCTAAGGCCTTCCTCACTCACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTG	1057276
C25	241	TCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTATCTCAGTTCCAGTGTG	300
CP006618.1		TCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTATCTCAGTTCCAGTGTG	1057336
C25	301	GCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATAGATCATCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCTACCAA	360
CP006618.1		GCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATAGATCATCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCTACCAA	1057396
C25	361	CTAGCTAATCTAACATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCCGCAGGGATTATA	420
CP006618.1		CTAGCTAATCTAACATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCCGCAGGGATTATA	1057456
C25	421	CAGTATTACCCACCATTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCCATATGCATTA	480
CP006618.1		CAGTATTACCCACCATTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCCATATGCATTA	1057516
C25	481	CTCACCCGTCTGCCACTAACTATTCTTTATAGCAAGCTATAAAGAAT	527
CP006618.1		CTCACCCGTCTGCCACTAACTATTCTTTATAGCAAGCTATAAAGAAT	1057563

Anexo 3. Alineamiento de las secuencias de las cuatro muestras de sangre positivas para *A. platys* y la secuencia parcial de *A. platys* (JQ894779.2), depositada en el GenBank. Diferencias entre las secuencias están indicadas en **negrita** y la posición subrayada.

	5	15	25	35	45
C126	-----	-----	-----	-----	-----
C329	-----	-----	-----	-----	-----
C140	-----	-----	-----	-----	-----
C346	-----	-----	-----	-----	-----
JQ894779.2	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	AACGAACGCT	GGCGGCAAGC	TTAACACATG

	55	65	75	85	95
C126	-----	-----	----GCTTGC	TATGATAAAA	ATTAGTGGCA
C329	-----	-----	----GCTTGC	TATGATAAAA	ATTAGTGGCA
C140	-----	-----	----GCTTGC	TATGATAAAA	ATTAGTGGCA
C346	-----	-----	----GCTTGC	TATGATAAAA	ATTAGTGGCA
JQ894779.2	CAAGTCGAAC	GGATTTTTGT	CGTAGCTTGC	TATGATAAAA	ATTAGTGGCA

	105	115	125	135	145
C126	GACGGGTGAG	TAATGCATAG	GAATCTACCT	AGTAGTATGG	GATAGCCACT
C329	GACGGGTGAG	TAATGCATAG	GAATCTACCT	AGTAGTATGG	GATAGCCACT
C140	GACGGGTGAG	TAATGCATAG	GAATCTACCT	AGTAGTATGG	GATAGCCACT
C346	GACGGGTGAG	TAATGCATAG	GAATCTACCT	AGTAGTATGG	GATAGCCACT
JQ894779.2	GACGGGTGAG	TAATGCATAG	GAATCTACCT	AGTAGTATGG	GATAGCCACT

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      155          165          175          185          195
C126   AGAAATGGTG GGTAATACTG TATAATCCCT GCGGGGGAAA GATTTATCGC
C329   AGAAATGGTG GGTAATACTG TATAATCCCT GCGGGGGAAA GATTTATCGC
C140   AGAAATGGTG GGTAATACTG TATAATCCCT GCGGGGGAAA GATTTATCGC
C346   AGAAATGGTG GGTAATACTG TATAATCCCT GCGGGGGAAA GATTTATCGC
JQ894779.2   AGAAATGGTG GGTAATACTG TATAATCCCT GCGGGGGAAA GATTTATCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      205          215          225          235          245
C126   TATTAGATGA GCCTATGTTA GATTAGCTAG TTGGTAGGGT AAAGGCCTAC
C329   TATTAGATGA GCCTATGTTA GATTAGCTAG TTGGTAGGGT AAAGGCCTAC
C140   TATTAGATGA GCCTATGTTA GATTAGCTAG TTGGTAGGGT AAAGGCCTAC
C346   TATTAGATGA GCCTATGTTA GATTAGCTAG TTGGTAGGGT AAAGGCCTAC
JQ894779.2   TATTAGATGA GCCTATGTTA GATTAGCTAG TTGGTAGGGT AAAGGCCTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      255          265          275          285          295
C126   CAAGGCGGTG ATCTATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGAA
C329   CAAGGCGGTG ATCTATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGAA
C140   CAAGGCAGTG ATCTATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGAA
C346   CAAGGCAGTG ATCTATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGAA
JQ894779.2   CAAGGCAGTG ATCTATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305          315          325          335          345
C126   CTGAGATACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA
C329   CTGAGATACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA
C140   CTGAGATACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA
C346   CTGAGATACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA
JQ894779.2   CTGAGATACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA

```


	355	365	375	385	395
C126	CAATGGGCGC	AAGCCTGATC	CAGCTATGCC	GCGTGAGTGA	GGAAGGCCTT
C329	CAATGGGCGC	AAGCCTGATC	CAGCTATGCC	GCGTGAGTGA	GGAAGGCCTT
C140	CAATGGGCGC	AAGCCTGATC	CAGCTATGCC	GCGTGAGTGA	GGAAGGCCTT
C346	CAATGGGCGC	AAGCCTGATC	CAGCTATGCC	GCGTGAGTGA	GGAAGGCCTT
JQ894779.2	CAATGGGCGC	AAGCCTGATC	CAGCTATGCC	GCGTGAGTGA	GGAAGGCCTT

	405	415	425	435	445
C126	AGGGTTGTAA	AACTCTTTCA	GTGGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCCACAGAA
C329	AGGGTTGTAA	AACTCTTTCA	GTGGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCCACAGAA
C140	AGGGTTGTAA	AACTCTTTCA	GTGGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCCACAGAA
C346	AGGGTTGTAA	AACTCTTTCA	GTGGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCCACAGAA
JQ894779.2	AGGGTTGTAA	AACTCTTTCA	GTGGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCCACAGAA

	455	465	475	485	495
C126	GAAGTCCCGG	CAAACCTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGGGCA
C329	GAAGTCCCGG	CAAACCTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGGGCA
C140	GAAGTCCCGG	CAAACCTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGGGCA
C346	GAAGTCCCGG	CAAACCTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGGGCA
JQ894779.2	GAAGTCCCGG	CAAACCTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGGGCA

	505	515	525	535	545
C126	AGCGTTGTTT	GGAATTATTG	GGCGTAAAGG	GCATGTAGGC	GGTTCGGTAA
C329	AGCGTTGTTT	GGAATTATTG	GGCGTAAAGG	GCATGTAGGC	GGTTCGGTAA
C140	AGCGTTGTTT	GGAATTATTG	GGCGTAAAGG	GCATGTAGGC	GGTTCGGTAA
C346	AGCGTTGTTT	GGAATTATTG	GGCGTAAAGG	GCATGTAGGC	GGTTCGGTAA
JQ894779.2	AGCGTTGTTT	GGAATTATTG	GGCGTAAAGG	GCATGTAGGC	GGTTCGGTAA

	555	565	575	585	595
C126	GTTAAAGGTG	AAATGCCAGG	GCTTAACCCT	GGAGCTGCTT	TTAATACTGC
C329	GTTAAAGGTG	AAATGCCAGG	GCTTAACCCT	GGAGCTGCTT	TTAATACTGC
C140	GTTAAAGGTG	AAATGCCAGG	GCTTAACCCT	GGAGCTGCTT	TTAATACTGC
C346	GTTAAAGGTG	AAATGCCAGG	GCTTAACCCT	GGAGCTGCTT	TTAATACTGC
JQ894779.2	GTTAAAGGTG	AAATGCCAGG	GCTTAACCCT	GGAGCTGCTT	TTAATACTGC

	605	615	625	635	645
C126	CAGACTCGAG	TCCGGGAGAG	GATAGCGGAA	TTCCTAGTGT	AGAGGTGAAA
C329	CAGACTCGAG	TCCGGGAGAG	GATAGCGGAA	TTCCTAGTGT	AGAGGTGAAA
C140	CAGACTCGAG	TCCGGGAGAG	GATAGCGGAA	TTCCTAGTGT	AGAGGTGAAA
C346	CAGACTCGAG	TCCGGGAGAG	GATAGCGGAA	TTCCTAGTGT	AGAGGTGAAA
JQ894779.2	CAGACTCGAG	TCCGGGAGAG	GATAGCGGAA	TTCCTAGTGT	AGAGGTGAAA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      655      665      675      685      695
C126   TTCGTAGATA TTAGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT ATCTGGTCCG
C329   TTCGTAGATA TTAGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT ATCTGGTCCG
C140   TTCGTAGATA TTAGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT ATCTGGTCCG
C346   TTCGTAGATA TTAGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT ATCTGGTCCG
JQ894779.2 TTCGTAGATA TTAGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT ATCTGGTCCG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      705      715      725      735      745
C126   GTACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATAACC
C329   GTACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATAACC
C140   GTACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATAACC
C346   GTACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATAACC
JQ894779.2 GTACTGAC-- -----

```

```

.....|.....| .....|.....|
      755      765
C126   CTGGTAGTCC ACGCTGTAA
C329   CTGGTAGTCC ACGCTGTAA
C140   CTGGTAGTCC ACGCTGTAA
C346   CTGGTAGTCC ACGCTGTAA
JQ894779.2 -----

```