



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“PREVALENCIA DE *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*
EN PERROS DOMÉSTICOS INFESTADOS CON GARRAPATAS EN
EL MUNICIPIO DE TACÁMBARO, MICHOACÁN”.**



TESIS QUE PRESENTA:
IVONNE AMELIA PÉREZ PATRACA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA.**

ASESOR:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS. SALVADOR PADILLA ARELLANES.

COASESORA:
MAESTRA EN CIENCIAS. LESLIE GARATE GALLARDO.

MORELIA MICHOACÁN, NOVIEMBRE 2014



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“PREVALENCIA DE *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*
EN PERROS DOMÉSTICOS INFESTADOS CON GARRAPATAS EN
EL MUNICIPIO DE TACÁMBARO, MICHOACÁN”.**

TESIS QUE PRESENTA:

IVONNE AMELIA PÉREZ PATRACA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA.**

ASESOR:

MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS VETERINARIAS ZOOTECNISTAS: SALVADOR PADILLA
ARELLANES.

COASESORA:

MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS VETERINARIAS ZOOTECNISTAS. LESLIE GARATE GALLARDO.

MORELIA MICHOACÁN, NOVIEMBRE 2014



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Aprobación de Impresión del Trabajo

Morelia, Michoacán, 16 de octubre de 2014

C. DR. JOSÉ LUIS SOLORIO RIVERA

Director de la FMVZ-UMSNH

P R E S E N T E .

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis titulada: "**PREVALENCIA DE *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* EN PERROS DOMÉSTICOS INFESTADOS CON GARRAPATAS EN EL MUNICIPIO DE TACÁMBARO, MICHOACÁN**", forma parte del proyecto de investigación "*Prevalencia de Ehrlichiosis y Anaplasmosis canina en diferentes estados de Michoacán y su importancia como potencial zoonótico*", aprobado por el Consejo de Investigación Científica de la UMSNH, como parte del programa de investigación 2013, desarrollada por el **P. MVZ. IVONNE AMELIA PÉREZ PATRACA**, dirigida por el asesor **MC. SALVADOR PADILLA ARELLANES**, fue **revisada y aprobada** por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ATENTAMENTE

MC. NORMA LETICIA A. ALVARADO ENRÍQUEZ

PRESIDENTE

MVZ. ESP. NORMA AVILÉS TORRES

VOCAL

MC. SALVADOR PADILLA ARELLANES

VOCAL (ASESOR)

www.vetzoo.umich.mx

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco infinitamente con todo mi corazón a mi mamá Rosa María y a mi papá Arturo por su inmenso amor pero sobre todo por su apoyo incondicional y su motivación para seguir adelante en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, por sus consejos siempre bien acertados, Pero sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi hermano Iván por ser una parte muy importante de mi vida y representar la unión familiar, por llenar mi vida de alegrías y amor pero sobre todo de fortaleza, consejo y motivación para seguir adelante.

Le agradezco a mi asesor de tesis M.C. Salvador Padilla y coasesora M.C. Leslie Garate por el apoyo, su valiosa orientación y dedicación de tiempo para la conclusión de este trabajo. También agradezco por compartir siempre sus conocimientos pero sobre todo por brindarme su amistad.

Agradezco el apoyo para la realización de este trabajo al laboratorio de patología clínica de la clínica para perros y gatos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	2
2.1.- SINONIMIAS	2
2.2.- ETIOLOGÍA.....	2
2.2.1. INFECCIÓN POR <i>A. phagocytophilum</i>	2
2.2.2. INFECCIÓN POR <i>A. platys</i>	5
2. 3.- CICLO BIOLÓGICO.....	7
2.4.- EPIDEMIOLOGÍA.	9
3. PATOGÉNESIS.....	12
4. - HALLAZGOS CLÍNICOS	15
5. - DIAGNÓSTICO	17
5.1. - HALLAZGOS DE LABORATORIO CLÍNICO	18
5.1.1. - INFECCIÓN NATURAL	18
5.1.2.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	19
5.1.3. - DETECCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO	20
5.1.4.- PRUEBAS SEROLÓGICAS	20
5.1.5.- HALLAZGOS PATOLÓGICOS EN <i>A. platys</i>	22
6.- TRATAMIENTO	22
7.- PREVENCIÓN Y CONTROL.....	23
8.- CONSIDERACIONES A LA SALUD PÚBLICA.....	23
9. - OBJETIVOS	26
9.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
10.- HIPÓTESIS.	26
11.- MATERIAL Y MÉTODOS.	27
12.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
13.- CONCLUSIÓN.	39
14.- BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1.....	2
IMAGEN 2.....	6
IMAGEN 3.....	29
IMAGEN 4.....	30
IMAGEN 5.....	31
IMAGEN 6.....	37
IMAGEN 7.....	37

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.....	4
CUADRO 2.....	8
CUADRO 3.....	11

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1.....	32
GRÁFICA 2.....	33
GRÁFICA 3.....	35
GRÁFICA 4.....	36
GRÁFICA 5.....	37
GRÁFICA 6.....	38

“PREVALENCIA DE *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* EN PERROS DOMÉSTICOS INFESTADOS CON GARRAPATAS EN EL MUNICIPIO DE TACÁMBARO, MICHOACÁN”.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás De Hidalgo.

Pérez-Patraca, I. A¹., Padilla-Arellanes S²., Garate-Gallardo L³.

RESUMEN

La anaplasmosis canina es provocada por dos agentes infecciosos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* formado por organismos intracelulares Gram negativos obligatorios que parasitan leucocitos, eritrocitos, células endoteliales o plaquetas. Es transmitida por garrapatas duras (*Ixodidae*) que afecta a los animales y al ser humano. Se distribuye en zonas geográficas con características tropicales y subtropicales y siendo una enfermedad zoonótica es importante saber y conocer la existencia de esta enfermedad en el estado de Michoacán, México. El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de Anaplasmosis en perros del municipio de Tacámbaro, Michoacán infestados con garrapatas. Se muestrearon 30 perros y se obtuvo una seroprevalencia del 23% con el kit de ELISA. En las capas leucoplaquetarias se observó en el 100% de los animales mórulas de *Anaplasma platys* y en ningún animal mórulas de *Anaplasma phagocytophilum*. Concluimos que existe la anaplasmosis en el estado de Michoacán, siendo el primer reporte en este estado, sin embargo se recomiendan más pruebas para investigar si en realidad no existe *Anaplasma phagocytophilum*.

Palabras clave: *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, perro, Michoacán

ABSTRACT

Canine anaplasmosis is caused by two infectious agent belonging to the family Anaplasmataceae, they are obligate intracellular Gram negative organisms that parasitic leukocytes, erythrocytes, platelets or endothelial cells. And they are transmitted by hard ticks (Ixodidae) that affects animals and humans. It is distributed in geographic areas with tropical and subtropical characteristics and being a zoonotic disease is important to know and understand the existence of this disease in the state of Michoacan, Mexico. The aim of this study was to determine the seroprevalence of anaplasmosis in dogs at Tacámbaro Township, Michoacán, infested with ticks. Thirty dogs were sampled and a seroprevalence of 23% with the ELISA kit was obtained. In the buffy coats were observed in 100% of animals morulae of *Anaplasma platys*, and any animal *Anaplasma phagocytophilum* morulae. We conclude that there are anaplasmosis in the state of Michoacan, and this is the first report in the state, however further testing is recommended to investigate whether there is *Anaplasma phagocytophilum* in reality.

Keywords: *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, dog, Michoacán

¹ Tesista. Ivonne Amelia Pérez Patraca ivonne_pp@hotmail.com

²Asesor. Coordinador del Laboratorio Clínico en la Clínica Veterinaria para Perros y Gatos de la FMVZ-UMSNH salvador25@hotmail.com

³Coasesor. Coordinadora de Planeación y Evaluación Educativa de la FMVZ-UMSNH leslie_garate@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La Anaplasmosis aparece en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo incluyendo Sudamérica y América Centra, los EE.UU., sur de Europa, África, Asia y Australia. Son pequeñas bacterias en forma de cocos, pleomórficas, Gram negativas intracelulares obligadas que se replican dentro de vacuolas de las células del hospedador formando mórulas con el potencial de causar una enfermedad en los seres humanos y varias especies de mamíferos. Proviene del orden de las *Rickettsiales* que se refiere a un gran número de bacterias Gram negativas intracelulares obligatorias. Anteriormente se conocía como *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* y ehrlichiosis granulocítica humana. Esta enfermedad es transmitida por 16 especies de garrapatas de 7 géneros. (*Boophilus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Hyalomma*, *Argas* y *Ornithodoros*). El periodo de incubación es de 1 a 21 días posterior a la picadura de una garrapata, en su fase aguda presenta Síndrome febril, depresión, anorexia, linfadenomegalia, secreción ocular o nasal, pérdida de peso leve, vasculitis, anemia no regenerativa de leve a moderada, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia. Las pruebas para detectar la Anaplasmosis son las de detección de anticuerpos séricos específicos, Inmunofluorescencia indirecta IFA y ELISA (Snap 4x) y, por medio de la realización de capas leucoplaquetarias. Actualmente se usan las tetraciclinas e imidocarbamol para el tratamiento, aparte con la ayuda de desparasitantes externos para el control de la garrapata y lograr la disminución en infecciones de la enfermedad.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- SINONIMIAS

Antiguamente a esta enfermedad se le conocía como *Cytoecetes phagocytophila canina*. (DeSC, 2013), *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, Agente de la *Ehrlichia granulocítica humana* y se unificaron como una sola especie que actualmente es reclasificadas como *Anaplasma phagocytophila*. (Chen y col, 1994). En cuanto a *Anaplasma platys* se le conoce también como Anaplasmosis trombocitotrópica. (Greene, 2008.)

2.2.- ETIOLOGÍA

2.2.1. INFECCIÓN POR *A. phagocytophilum*

La enfermedad provocada por *A. phagocytophilum* se denomina de manera apropiada *Anaplasmosis granulocitotrópica canina*. (Greene, 2008.)

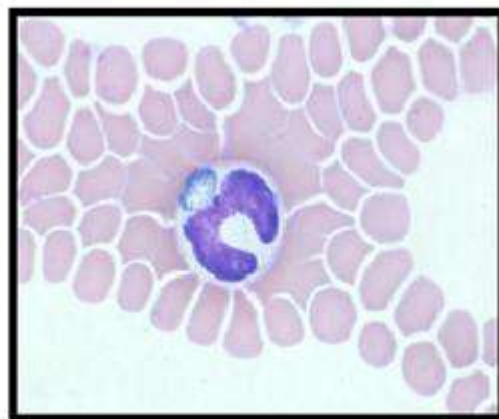


Imagen 1. Mórula de *A. phagocytophilum*, (infectious Organisms blood smear, consulta en línea)

La familia *Anaplasmataceae* está formado por organismos intracelulares Gram negativos obligatorios que parasitan leucocitos, eritrocitos, células endoteliales o plaquetas. Estos agentes son transmitidos de modo natural a seres humanos y animales domésticos desde garrapatas específicas que adquieran las infecciones por alimentarse de mamíferos de vida silvestre. (Greene, 2008.)

La Anaplasmosis canina se ha denominado como una enfermedad de infecciones bacterianas transmitida por garrapatas duras (*Ixodidae*) que afecta a los animales y al ser humano. (Carter, 1994). Hay dos grandes familias definidas dentro de las *Rickettsiales*, las *Rickettsiaceae* que incluye los géneros *Rickettsia*, *Orientia* y *Coxiella*. Y las *Anaplasmataceae*, que incluye los géneros *Anaplasma*, *Aegyptianella*, *Haemobartonella* y *Eperythrozoon*. (Carter, 1994).

Los miembros del orden *Rickettsiales* se reorganizaron en cuatro grupos genéticos:

Grupo 1: Amplía el género *Anaplasma*, incluyendo en él, además de las especies hasta entonces contenidas, como son *A. marginale*, *A. centrale* y *A. candidum*; a las especies *Ehrlichia phagocytophila* (hoy llamada *Anaplasma phagocytophilum*), *Ehrlichia bovis* (actualmente *Anaplasma bovis*) y *Ehrlichia platys* (hoy *Anaplasma platys*). (Sosa, 2011)

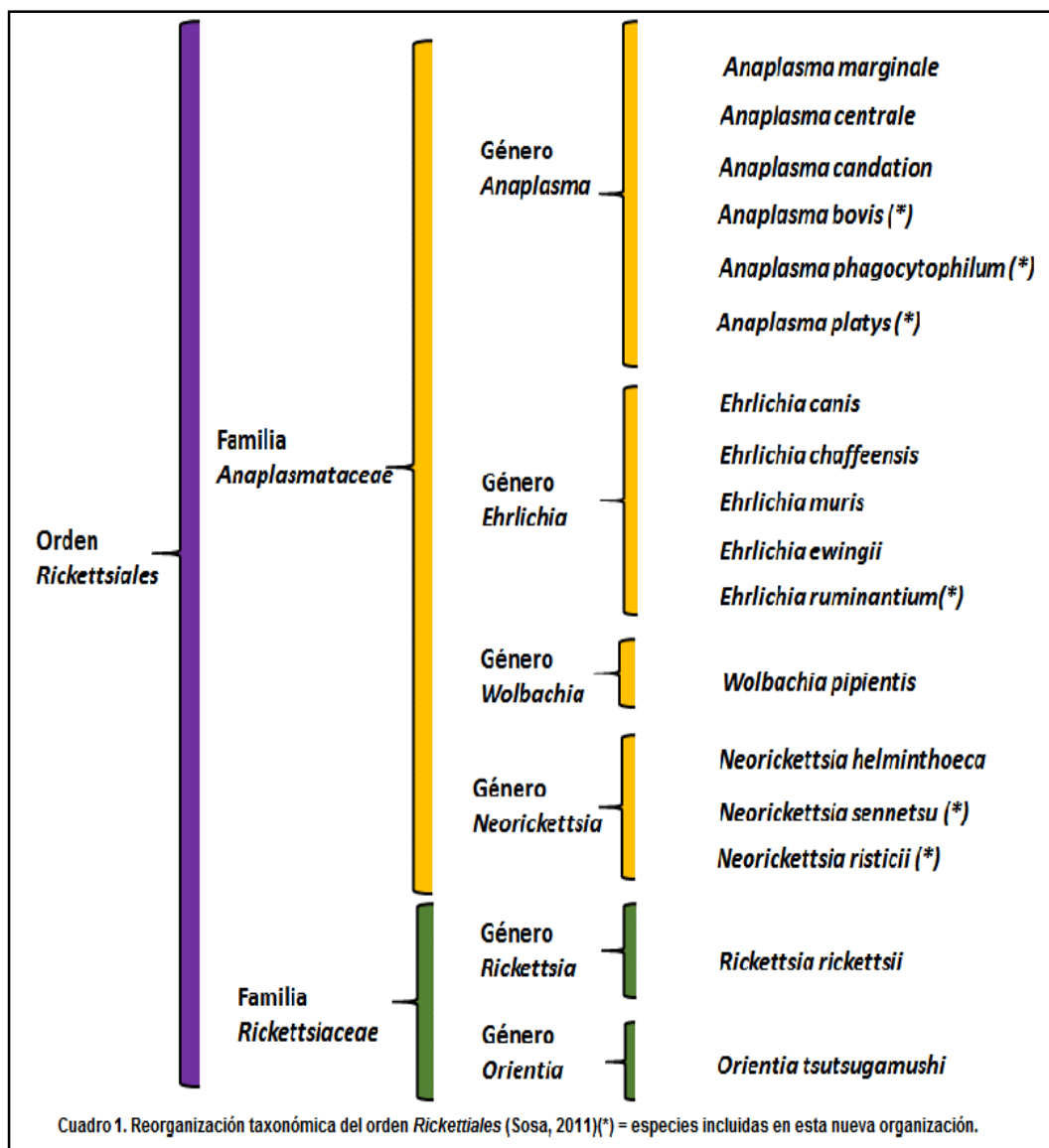
Grupo 2: el género *Ehrlichia* se amplía con la inclusión de *Cowdria ruminantium* (ahora *Ehrlichia ruminantium*). La especie tipo es *Ehrlichia canis*; otras especies de este género son *E. chaffensis*, *E. ewingii* y *E. muris*. (Sosa, 2011)

Grupo 3: el género *Neorickettsia*, cuya especie tipo es *N. helminthoeca*, quedaría ampliado al incluirse en el mismo a las especies *Ehrlichia risticii* y *Ehrlichia sennetsu* (que pasan a denominarse *N. risticii* y *N. sennetsu* respectivamente). (Sosa, 2011)

Grupo 4: la especie *Wolbachia* será el único miembro del género *Wolbachia*.

Actualmente se le han añadido dos géneros a la familia *Anaplasmataceae*: *Aegyptianella* y *Candidatus neoehrlichia*. Existe una alta reacción antigénica cruzada entre las especies del mismo grupo, ya que comparten varios antígenos superficiales homólogos, en cambio, entre las especies de grupos diferentes, esta

reacción antigénica cruzada es mucho menor. (Sosa, 2011). La Anaplasmosis proviene del orden *Rickettsiales*, Son pequeñas bacterias en forma de cocos, pleomórficas, Gram negativas intracelulares obligadas que se replican dentro de vacuolas rodeadas de membrana, vacuolas parasitóforas, dentro del citoplasma de un tipo específico de células hospedadoras, granulocitos, mononucleares y/o plaquetas, formando racimos llamados mórulas, con el potencial de causar una enfermedad en seres humanos y varias especies de mamíferos. (Sosa, 2011)



Estos microorganismos *Rickettsiales* pertenecen al Reino Proteobacteria, clasificadas como Alfa proteobacterias Gram negativas intracelulares obligadas, grupo que incluye un gran número de agentes oligótrofos (capaces de crecer en niveles bajos de nutrientes). Dentro de este Reino se encuentran también los géneros *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Vibrio*. (Sosa, 2011). Se presentan en formas bacilares, cocoides o pleomórficas, presentan dos paredes típicas de bacterias Gram negativas con ausencia de flagelos. Las formas bacilares son cortas, mientras que las cocoides se presentan aisladas, en pares, cadenas cortas o en filamentos). Estas bacterias tienden a ser muy pequeñas, teniendo un diámetro de 0.3 a 0.5 μm . Y una longitud de 0.8 a 2.0 μm . Estos agentes teñidos son fáciles de visualizar con el microscopio de luz. Con la tinción de Giemsa muestran color azul, con la de Macchiavello color rojo en contraste con el citoplasma teñido de azul que las rodea. Todos los microorganismos Rickettsiales son parásitos mutualistas. Las formas parásitas crecen en diversos tipos celulares (eritrocitos de vertebrados, células retículo-endoteliales y células del endotelio vascular), habitando a menudo en artrópodos que se alimentan de sangre, como garrapatas que actúan como vectores o como huéspedes primarios. Estos microorganismos carecen de la ruta glucolítica y no utilizan glucosa como fuente de energía, sino que oxidan glutamato y productos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como el succinato. Presentan un sistema de transporte mediado por transportador, de tal forma que los nutrientes y las coenzimas de la célula huésped se absorben y se utilizan de forma directa. (Greene, 2008.)

2.2.2. INFECCIÓN POR *A. platys*

Es un pequeño parásito Rickettsial plaquetario clasificado originalmente como *E. platys* provoca trombocitopenia cíclica infecciosa. La Rickettsia intraplaquetaria *A. platys* puede ser observada, mediante microscopía de luz, como pequeñas inclusiones de color azul oscuro a púrpura dentro de las plaquetas. La observación debe ser realizada en extendidos de sangre periférica o en frotis de capa blanca

(FCB), teñidos con colorantes tipo Romanowsky (Giemsa, Wright, Diff-Quick o Hemacolor) (Arraga, 2001)

Desde el punto de vista ultraestructural, el diámetro de los organismos varía entre 350 y 1250 nm. Son de forma ovalada similar a un poroto y los rodea una membrana doble. Es posible que las plaquetas infectadas contengan 1- 3 vacuolas únicas revestidas de membrana con 1 – 15 organismos por vacuolas. (Greene, 2008.)

Parece ser que los organismos ingresan en las plaquetas mediante adherencia a la superficie plaquetaria seguida de endocitosis. Por lo tanto es probable que la membrana de la vacuola se derive de la membrana plaquetaria externa. La repetición de fisión binaria de organismos dentro de la vacuola da como resultado la formación de una mórula. (Greene,

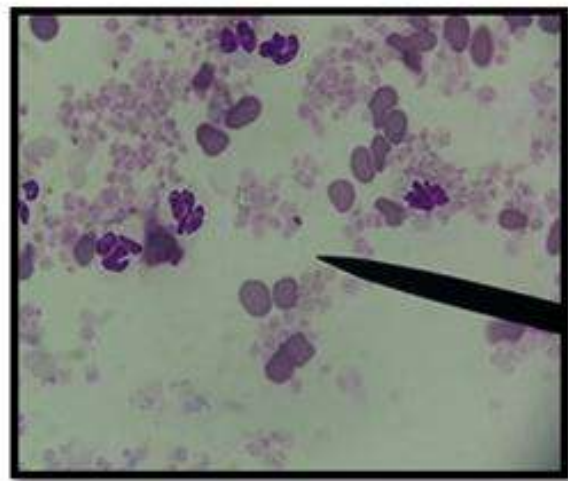


Imagen 2. *Anaplasma platys*; Archivo Personal

2008). Aunque todavía no se ha demostrado definitivamente, se cree que estos organismos se transmiten a los perros por *R. sanguineus* y pueden causar una leve enfermedad febril caracterizado por trombocitopenia cíclica en algunos perros, que pueden agravarse si hay coinfecciones. (Bowman, 2011)

Cada organismo anaplasma se encuentra rodeado de dos membranas, una interna y otra externa. Se han observado Anaplasma con dos configuraciones diferentes, una de núcleo denso y otro reticular. La conformación de núcleo denso, más pequeña, contiene un conglomerado de hebras de cromatina relativamente denso, pudiendo estar ubicado, tanto central como excéntricamente. La configuración reticular, más grande, contiene una matriz de hebras sueltas de cromatina, entre las

cuales están esparcidos los ribosomas. Ambas configuraciones sufren fisión binaria, lo que sugiere que sea poco probable que estén asociadas a un ciclo de desarrollo. Los organismos individuales varían en el tamaño, entre 0,35 a 1,55 μm de diámetro y, en la forma, encontrándose formas redondeadas, ovales o arriñonadas (Dumler, 2005).

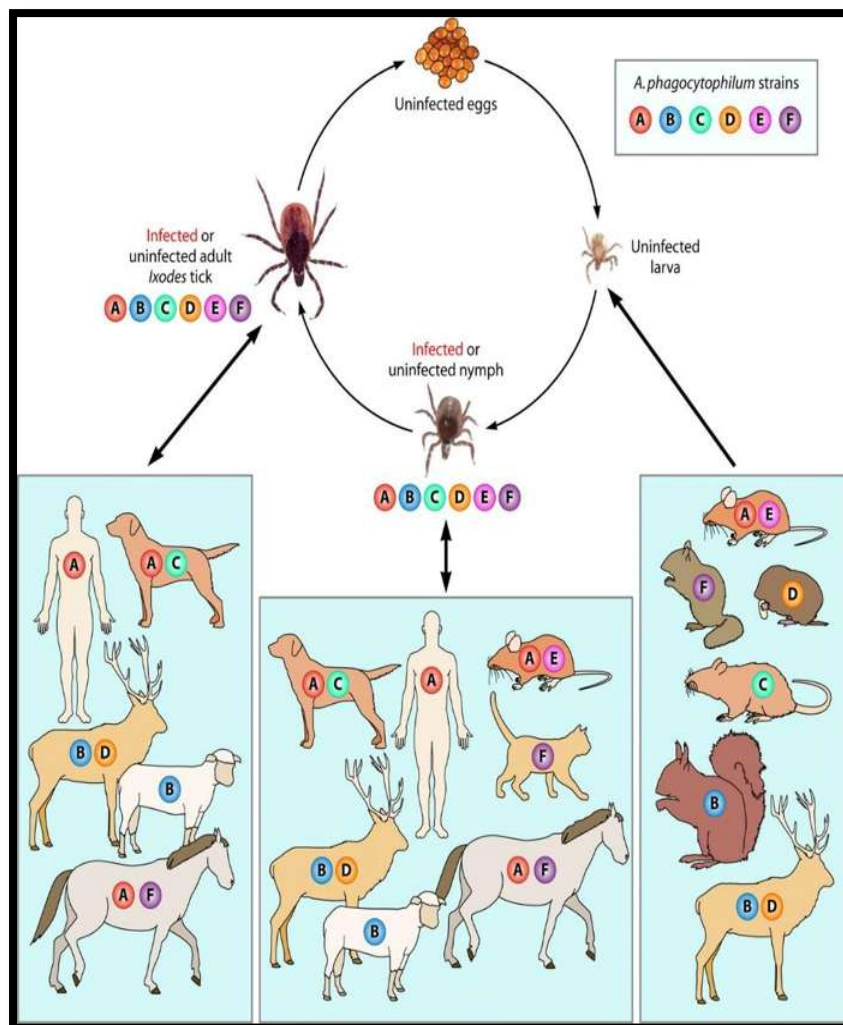
2. 3.- CICLO BIOLÓGICO.

La familia *Anaplasmataceae* incluye una amplia variedad de patógenos conocidos en medicina veterinaria. La Anaplasmosis no es contagiosa. La mayoría de la transmisión ocurre por vía de numerosas especies de garrapatas vectores, se han demostrado que al menos 16 especies de garrapatas de 7 géneros la transmiten (*Boophilus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Hyalomma*, *Argas* y *Ornithodoros*). Cabe mencionar que puede haber coinfecciones con otras especie de agentes como *Babesia canis*, *Mycoplasma haemocanis* (*Haemobartonella*), *Hepatozoon canis* así como parásitos, hongos o virus oportunistas. (Mujica, 2005) El ciclo de vida de las garrapatas duras (*Ixodidae*) debido a su cutícula más quitinizada, tiene un ritmo lento de alimentación. Cada estadio, antes de mudar, se alimenta durante días a semanas. (Mujica, 2005)

Los estadios evolutivos de las garrapatas son cuatro: Huevo, larvas, ninfas y adultos. La transición de larva a ninfa y de ninfa a adulto se lleva a cabo mediante metamorfosis con pérdida de cutícula (muda). El ciclo tiene fases de vida libre y de vida parasitaria. Las condiciones ambientales influyen sobre la duración de las etapas del ciclo en que las garrapatas no se hallan parasitando. (Greene, 2008.)

Todas las especies de garrapatas son parásitos obligados y requieren sangre y líquidos tisulares para su desarrollo. El efecto perjudicial sobre sus hospedadores es directo por medio de la succión de sangre y lesiones dérmicas e indirectas cuando transmiten protozoos, *rickettsias*, bacterias y virus. (Greene, 2008.)

Las especies *rickettsiales* incluidas en los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son transmitidas por picadura de garrapatas. La garrapata vector para la transmisión de *A. platys* no ha sido bien caracterizada, sin embargo, la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), *Dermaceter auratus* y *Hyaloma truncatum*, han sido sugeridas como posibles vectores de *A. platys*, aunque, la transmisión experimental de *A. platys* con estas garrapatas no ha sido aún demostrada (Haung, y col. 2005). Todos los miembros de la Familia *Anaplasmataceae* son bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, se replican dentro de una vacuola intracitoplasmática derivada de la membrana externa de la célula eucariótica hospedadora (Dumler y col, 2001).



Cuadro 2. Ciclo biológico de la garrapata e infección de diferentes cepas de *A. phagocytophilum* en diferentes organismos.

Los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Neorickettsia* se multiplican en células hematopoyéticas maduras o inmaduras, particularmente células mieloides como neutrófilos, eritrocitos y plaquetas, en sangre periférica o en tejidos, usualmente órganos fagocíticos mononucleares (hígado, bazo, médula ósea) de hospedadores vertebrados (Dumler y col, 2001). Aunque no se conoce el ligando en la célula hospedadora (plaqueta) para *A. platys*, se sabe que *A. Phagocytophilum* (agente de la ehrlichiosis granulocítica humana, EGH), se adhiere a su receptor en el neutrófilo, el ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PGSL-1), una proteína de superficie que porta ácido siálico y que comparte muchas características químicas con el ligando en el eritrocito para *A. marginale*, tales como la sensibilidad a la neuraminidasa y a la quimotripsina. El ciclo de vida de *A. platys* se conoce solo parcialmente, se sabe que se divide dentro de la plaqueta por fisión binaria (Dumler y col, 2001).

2.4.- EPIDEMIOLOGÍA.

La infección por *A. phagocytophilum* se confirmó por primera vez en perros de Minnesota y Wisconsin en 1996. Y tiene una distribución geográfica en todo el mundo, especialmente en América del Norte y Europa, así como en Sudáfrica, América del Sur y Asia. La infección con *A. phagocytophilum* ha sido reconocido en una variedad de huéspedes mamíferos, incluyendo seres humanos, gatos, perros, caballos, rumiantes, y especies de vida silvestre. (Strik y col, 2007).

La distribución geográfica de la enfermedad en humanos y animales domésticos en todo el mundo sigue la del vector *Ixodes spp.* que se alimenta de mamíferos grandes. Como resultado de un vector común, la distribución de esta enfermedad sigue la de la provocada por *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Son comunes las coinfecciones con estos dos organismos entre garrapatas, y es más probable que una aparición de enfermedad entre los 20 días de exposición a estas garrapatas se deba a *A.*

phagocytophilum que a *B. burgdorferi*, que presenta un período de incubación más largo hasta de 60 – 90 días. (Greene, 2008.)

En América de Norte se encuentra *A. phagocytophilum* en las regiones altas del centro, oeste y noroeste de los Estados Unidos, y en las regiones de la costa occidental desde California a Columbia Británica. En América del Sur se ha encontrado un solo perro positivo a PCR de *A. phagocytophilum* en Venezuela. En la región Europea, se han informado en casos de el Reino Unido, Noruega, Suiza, Alemania, Los Países Bajos y Eslovenia. En Corea, se ha detectado la *A. phagocytophilum* en forma genética en garrapatas *Ixodes persulcatus* y *Haemaphysalis longicornis* que se recogieron en campo o se encontraron en animales domésticos. (Greene, 2008.)

Se desconoce el potencial de la enfermedad de estos organismos. Los rangos y hábitos de alimentación de vectores de garrapata particulares determinan la distribución geográfica estacional de la infección por *A. phagocytophilum* varias garrapatas ixódidas del genero *Ixodes* son vectores de *A. phagocytophilum*. *I. scapularis* es el vector en regiones altas del centro oeste y norte de los Estados Unidos; *I. pacificus* es el vector en California y Columbia Británica, *I. ricinus* es el vector en Europa y Reino Unido. Como *A. phagocytophilum* se transfiere de forma transestadial sólo entre garrapatas, sólo las etapas de ninfa y adulto son portadoras potenciales de la enfermedad. (Greene, 2008.)

Aunque el medio de infección predominante es la transmisión por garrapata, se ha documentado la transmisión perinatal en seres humanos y la infección transplacentaria en vacas. Las infecciones con estos organismos pueden provocar abortos en vacas y ovejas, y se ha encontrado el organismo en leche de vacas infectadas; por lo tanto, debe considerarse el riesgo de propagación de estas infecciones en forma directa a recién nacidos. (Greene, 2008.). La enfermedad oscila

desde casos clínicos de leves a mortales, y los hallazgos asociados incluyen fiebre, anorexia, pérdida de peso, poliartritis, y, posiblemente, la meningitis. (Foley, 2001). Varios ixódidos pueden servir como vectores para la *Anaplasma*. En México, *Ixodes scapularis* es el vector más común. El organismo puede infectar a una amplia gama de mamíferos, incluyendo perros, gatos, caballos, rumiantes, personas y muchas especies de vida silvestre. La fauna como ciervos, roedores y otros pequeños mamíferos mantienen *A. phagocytophila* y sirven como reservorio de estas bacterias, transportándose en el interior de los animales y el hombre durante las picaduras de garrapata. (Preziosi, 2002). La mayoría de los estudios sobre la prevalencia de *A. phagocytophila* son llevados a cabo en zonas geográficas reducidas. Dichos estudios se efectúan en la vegetación y se utiliza la prueba de PCR como método de detección de bacterias, los países en donde se realizaron los estudios fueron en Estados Unidos y Europa ambos con gran incidencia de *A. phagocytophilum*. (Fernández, 2003)

Se conocen varias especies de este género las cuales pueden afectar a diferentes células y a diferentes animales. (Cuadro 3)

Tipo	Célula	Hospedador	Distribución Geográfica
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Granulocitos	Humanos Caninos	Europa América del Norte y del Sur, Norte de África
<i>Anaplasma equi</i>	Granulocitos	Equinos	Europa Estados Unidos
<i>Anaplasma platys</i>	Plaquetas	Caninos	América del Norte y del Sur
<i>Anaplasma marginale</i> <i>Anaplasma centrale</i>	Eritrocitos	Bovinos	Estados Unidos, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay, Argentina
<i>Anaplasma ovis</i>	Eritrocitos	Ovinos y caprinos	Estados Unidos
Cuadro 3. Tipos de Anaplasmas que afectan a diferentes células y animales (Sosa, 2011)			

Se informó por primera vez *A. platys* en los Estados Unidos en 1978 y más tarde en Europa Occidental, Asia, América del Sur, el Medio Oriente, Australia y África. (Haung, 2005). Por último, la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la confirmación por el análisis de la secuencia de los productos de PCR amplificados, se considera la prueba de diagnóstico más fiable para *A. platys* hasta la fecha. A pesar de la distribución mundial de *A. platys*, la información disponible sobre la diversidad genética de cepas de esta *Rickettsia* es limitada, siendo realizados estudios en este campo en: China, EUA, Venezuela, Tailandia, Japón, Francia, Australia, Italia, Brasil, Chile, Isla de Granada. En Venezuela se han reportado dos cepas: *A. platys* Venezuela, y *A. platys*, aisladas a partir de la sangre de perros infectados naturalmente con esta *Rickettsia*. (Greene, 2008.)

No se ha encontrado predisposiciones de sexo para infecciones caninas por *A. phagocytophilum*. Aunque podría establecerse una predisposición de raza en el futuro, los casos documentados son demasiados pocos en la actualidad como para sacar conclusiones. Pero de un estudio realizado Minnesota y Wisconsin se observó que los porcentajes más altos eran para las razas labrador y Golden retrievers con el 28% y 18% respectivamente. Y otro estudio realizado en 14 perros suecos infectados con *A. phagocytophilum* 6 eran Golden retrievers 2 samoyedos y 6 de distintas razas. Los Golden y labradores retrievers son razas muy populares y es posible que el alto número de casos de infecciones en ellas solo representan los populares que son. (Greene, 2008.)

3. PATOGÉNESIS

Se requiere un tiempo mínimo de alimentación de 24 horas e inclusión de 48 horas o más para que las garrapatas *Ixodes spp* transmitan *A. phagocytophilum* a huésped mamífero susceptible. El período de incubación de la enfermedad después de una mordedura de garrapata es de 1 a 2 semanas. (Greene, 2008.)

Se sabe que la P – selectina ligando 1 es un receptor de neutrófilos de superficie de *A. phagocytophilum*; esta glucoproteína de superficie celular es rica en la superficie de neutrófilos. Después de unirse al receptor de superficie celular, la bacterias de *A. phagocytophilum* ingresan a los neutrófilos vía endocitosis y se incorporan a los fagosomas. Los organismos provienen de la fusión fagolisosoma. Obstruyen la actividad - oxidativa celular estallido respiratorio del complejo enzimático oxidasa del fosfato dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) e inhiben la apoptosis celular. (Greene, 2008.)

Mediante estos mecanismos, las bacterias de *A. phagocytophilum* evitan la destrucción por células designadas para asesinar microbios. Dentro del fagosoma, las bacterias comienzan a multiplicarse por fisión binaria. La replicación produce veinte o más organismos, y forman la clásica “mórula” (mora) que se observa con el microscopio de luz, una característica distintiva de enfermedades por Ehrlichia. El fagosoma cargado de bacterias y la membrana plasmática celular de huésped se rompen eventualmente y liberan organismos para infectar células nuevas. Se encuentra células infectadas con *A. phagocytophilum* en neutrófilos en sangre periférica y en tejidos del sistema fagocítico mononuclear (bazo, hígado y médula ósea). (Greene, 2008.)

Se desconoce el modo exacto que *A. phagocytophilum* provoca la enfermedad, las alteraciones en el huésped nos son típicas porque el organismo no posee endotoxinas y las células infectadas no liberan citocinas proinflamatorias clásicas, interleucina (IL), IL – 6 o factores de necrosis tumoral alfa. Se ha encontrado que otros mecanismos provocan trombocitopenia, leucopenia y anemia en huéspedes infectados. Después de las 8 a 10 días iniciales de infección, se cree que la inmunidad humoral es responsable del control de la infección. (Greene, 2008.)

En *A. platys* el periodo de incubación después de la infección intravenosa experimental en perros es de 8 a 15 días. El mayor porcentaje de plaquetas parasitadas ocurre durante el episodio parasitémico inicial. Dentro de los pocos días de aparición de plaquetas parasitarias, el recuento de plaquetas disminuye en forma precipitada y, en general no vuelven a observarse organismos. Por lo común, los recuentos de plaquetas disminuyen a un nivel inferior a 20.000/ul. Con relación a los episodios parasitémicos, después de la desaparición de los microorganismos, los recuentos aumentan rápidamente, y alcanzan los valores normales dentro de los 3 a 4 días. (Greene, 2008.)

Ocurren parasitemias y episodios posteriores de trombocitopenia en intervalos de 1 a 2 semanas. A pesar de que el porcentaje de plaquetas infectadas disminuye hasta un nivel del 1% inferior con parasitemias posteriores, los episodios de trombocitopenia son tan graves como los que se presentan después de la parasitemia inicial. Mientras que es posible que la trombocitopenia inicial se desarrolla sobre todo como consecuencia de una lesión directa a plaquetas mediante organismos que se replican, puede que los mecanismos mediados por respuesta inmune de remoción plaquetaria sean más importantes durante episodios posteriores de trombocitopenia. La naturaleza cíclica de las parasitemias y los episodios de trombocitopenia disminuyen con el tiempo y dan como resultado trombocitopenia leve que se resuelve lentamente junto con organismos que aparecen de forma espontánea en plaquetas sanguíneas. (Greene, 2008.)

En algunos casos ha habido disminuciones transitorias de recuentos totales de leucocitos en forma concomitante con parasitemias pero, en general, los valores no disminuyen a niveles inferiores a los intervalos de referencia en perros. Es posible que ocurran anemias normocrómicas normocíticas leves durante el primer mes de infección. Sobre la base de estudios de médula ósea y hierro sérico, es posible que las disminuciones de hematócrito se atribuyan a la anemia de síndrome inflamatorio. Pueden presentarse aumentos leves a moderados en inmunoglobulinas y proteínas

de fase aguda y una disminución leve de albumina en muestras séricas. (Greene, 2008.)

Se sospecha que la transmisión a huéspedes susceptibles requiere la fijación de la garrapata por un periodo prolongado y de alimentación de por lo menos 24 horas o más. El periodo de incubación es de 7 a 21 días posterior a la picadura de una garrapata, en su fase aguda presenta síndrome febril. La Anaplasmosis empieza por replicarse en células fagocíticas mononucleares en bazo, hígado, nódulos linfáticos para después diseminarse, afectando el endotelio vascular. (Comité Editorial. 2000)

4. - HALLAZGOS CLÍNICOS

Se identificaron todos los casos naturales informados de infección canina por *A. phagocytophilum* por hallazgos de mórulas en neutrófilos circulantes. En cada estudio publicado de casos naturales, se confirmó infección por *A. phagocytophilum* por la secuencia del gen microbiano 16S de ARNr de solo una parte de los perros, los otros casos caninos no confirmados desde el punto de vista genéticos eran de regiones endémicas de *A. phagocytophilum* que se encontraban fuera de rango de *E. ewingii* o el vector garrapata, *A. americanum*, y se presumió infección por *A. phagocytophilum*. (Greene, 2008.)

La mayoría de los perros con *A. phagocytophilum* no presentan signos específicos de la enfermedad. Los hallazgos más consistentes son fiebre (39,2 °C [102,6 °F] o superior) letargia o depresión y anorexia, que ocurre en el 75% de los perros. En más de la mitad de los perros, es evidente el dolor musculoesquelético o malestar, caracterizado por una renuencia a moverse, rigidez, debilitamiento, úlceras y cojera. Menos del 10% de los perros muestran dolor de articulaciones. (Greene, 2008.)

Parece que los perros son susceptibles a reinfección por *A. phagocytophilum*. Se han identificado casos individuales de infecciones por *A. phagocytophilum* en perros 2 veces, como 5 meses o más de intervalo sin enfermedad entre infecciones

documentales. Los títulos de anticuerpos séricos en perros tratados se revierten a niveles bajos o negativo, lo cual probablemente los haría susceptibles a una reinfección. (Greene, 2008.)

En la fase aguda se presenta fiebre, depresión, anorexia, linfadenomegalia, secreción ocular o nasal, pérdida de peso leve, tiempos de coagulación aumentados, vasculitis, anemia no regenerativa de leve a moderada, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia. (Quinn, 2002).

La fase subclínica puede tardar meses o años. La fase crónica presenta trombocitopenia y leucopenia severa, hipoplasia o aplasia medular, hemorragias, signos neurológicos, signos oculares, síndrome de inmunodeficiencia, infecciones secundarias, muerte por complicaciones. (Quinn, 2002).

En la *A. platys* se ha reconocido signos clínicos mínimos en perros infectados en forma experimental en los Estados Unidos. En ocasiones, se ha observado aumento leve de temperatura rectal durante parasitemias iniciales y se ha reconocido hematoquecia en algunos perros trombocitopénicos. La esplenectomía antes de la infección experimental da como resultado recuentos plaquetarios preinoculación más alto, pero no altera la periodicidad de las parasitemias o la gravedad de la enfermedad. (Greene, 2008.)

No parece que la edad del animal provoque un efecto significativo en el curso de la infección; los hallazgos clínicos y hematológicos en un grupo de 3 cachorros destetados fueron similares a los de los perros maduros. En la mayoría de los perros infectados en forma natural, también aparecen signos leves, pero se han informado signos clínicos graves, incluso fiebre y uveítis, en un perro, y hemorragias equimóticas y petequias y epistaxis en otro perro, en casos naturales en los Estados Unidos.

(Greene, 2008.) Se han informado signos clínicos, incluso fiebre, letargia, mucosas pálidas, hemorragias petequiales de la piel y mucosas orales, disminución del apetito, pérdida de peso, descargas nasales purulentas y linfadenomegalia. Es posible que la aparición de *A. platys* con otros agentes infecciosos (por ej. *E. canis*, *Babesia canis*) potencie esta enfermedad clínica provocada por estos agente solos. Finalmente, incluso si la infección por *A. platys* provoca enfermedad clínica en pocas ocasiones como agente único debe considerarla en la lista de diagnóstico diferencial de trombocitopenia en perros. (Greene, 2008.)

5. - DIAGNÓSTICO

En ejemplares con signos clínicos de la enfermedad y contacto con garrapatas, de 7 a 21 días, se puede observar una combinación de signos clínicos, anormalidades hematológicas y hallazgos de laboratorio. Las anormalidades hematológicas más comunes son: anemia no regenerativa, trombocitopenia, leucopenia y pancitopenia está producida por hipoplasia de células precursoras en la medula ósea, ocurre en fase crónica grave y con mayor frecuencia en perros de la raza Pastor Alemán. (Heikkilä y col. 2010.)

El clima influye en la actividad de la garrapatas (es decir, principios de primavera u otoño e invierno cálidos pueden dar como resultado casos en momento no esperados). Los datos de estación, historia, signos clínicos, hematológicos (en particular, la observación de mórulas en neutrófilos) y de química clínica y serológico pueden ayudar a realizar un claro diagnóstico presuntivo de infección por *A. phagocytophilum*, pero el diagnóstico definitivo depende del análisis de ADN microbiano por medio de PCR. (Greene, 2008.)

Puede diagnosticarse infección por *A. platys* mediante el hallazgo de organismos dentro de plaquetas en películas sanguíneas coloreadas. Se ha descrito un

procedimiento de coloración inmunocitoquímicas de avidina – biotina que pueda identificar mórulas específicamente en plaquetas, y puedan ayudar a diferenciar organismos de gránulos plaquetarios grandes o remanentes de núcleos de megacariocitos. Además, las inclusiones de plaquetas se colorearon en forma positiva en una prueba indirecta de AF con suero anti- *A. phagocytophilum* de ratón. (Greene, 2008.)

Los sueros de perros infectados en forma experimental con *A. platys* cambian de negativo a positivo en coincidencia con el punto máximo de la primera parasitemia o poco tiempo después. Sobre la base de estudios serológicos, parece que la infección por *A. platys* está ampliamente distribuida en los Estados Unidos. Hasta un tercio de los perros trombocitopénicos de Florida y Louisiana presentan títulos positivos, y más del 50% de los perros seropositivos a *E. canis* presentan también títulos positivos a *A. platys*. Es probable que la evidencia de reacciones serológicas positivas a ambos organismos en muestras séricas de algunos perros represente infecciones combinadas, dado que otros perros muestran títulos positivos a uno solo de los agentes. (Greene, 2008.)

Pruebas serológicas: detección de anticuerpos séricos específicos, Inmunofluorescencia indirecta IFI, ELISA: Snap 4x. Técnicas de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa PCR, secuenciación del ADN obtenido por PCR y PCR en tiempo real. (Heikkilä, 2010.)

5.1. - HALLAZGOS DE LABORATORIO CLÍNICO

5.1.1. - INFECCIÓN NATURAL

Se identificaron todos los casos naturales informados de infección canina por *A. phagocytophilum* mediante el hallazgo de mórulas en neutrófilos circulantes con

microscopio de luz con coloración hematológicas de rutina. Casi todos los hallazgos de laboratorio clínico informados pertenecían a muestras recogidas durante la fase bacteriémica, que puede durar poco tiempo, de 1 a 9 días en infecciones experimentales. Salvo por la presencia de mórulas, el hallazgo de laboratorio más útil desde el punto de vista diagnóstico es la trombocitopenia leve a grave, que presenta más del 80% de los casos. Además más del 90% de los perros infectados de Minnesota y Wisconsin están linfopénicos, y muchos en formas graves. Menos del 50% de los perros muestran anemia normocítica normocrómica no regenerativa leve a moderada. Se ha registrado proteinuria significativa, el 50% de los perros presentan hipoalbuminemia leve a moderada. La actividad de la fosfatasa alcalina sérica se ve aumentada en un 65% o más, también se ha documenta la proteinuria. (Greene, 2008.)

5.1.2.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Los perros infectados en forma experimental con la cepa sueca de *A. phagocytophilum* desarrollan trombocitopenia con aumento del volumen de plaquetas promedio, una linfopenia con una duración de 1 a 3 días seguida de linfocitosis con la presencia de eritrocitos blastoestimulados, una anemia normocítica normocrómica no regenerativa leve y mórulas en el 3 al 34 % de los neutrófilos circulantes. Se observan mórulas en neutrófilos durante 4 a 9 días. Se producía eosinopenia mientras los perros estaban bacteriémicos. Durante la bacteriemia, se desarrolló una disminución de hierro, pero los niveles normales regresaron 1 semana después de la desaparición de las mórulas, ocurrió hipoalbuminemia e hiperfibrinogenemia cuando los perros presentaban un estado febril, y los valores regresaron a los niveles de rango de referencia 1 semana después de que disminuyera la fiebre. (Greene, 2008.)

5.1.3. - DETECCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

La PCR es una herramienta de diagnóstico más sensible que el hallazgo de mórulas circulantes y proporciona un diagnóstico confiable específico de especie. Se desarrolló PCR específica de *A. phagocytophilum*. La PCR permite un diagnóstico específico mientras que puede resultar difícil realizar pruebas serológicas mediante la actividad cruzada a bacterias Rickettsiales estrechamente relacionadas. Los perros infectados en forma experimental son positivos a PCR de *A. phagocytophilum* 6 a 8 días antes de la primera aparición de mórulas en sangre periférica. Se dispone de pruebas de PCR para el gen 16S de ARNr de *A. phagocytophilum* en una pequeña cantidad de laboratorios veterinarios de diagnóstico privados o estatales. Resulta óptimo entregar sangre periférica anticoagulada de EDTA para pruebas de PCR. Deben tomarse muestras antes de administrar antibióticos. (Greene, 2008.)

5.1.4.- PRUEBAS SEROLÓGICAS

Los títulos de anticuerpos *A. phagocytophilum* pueden revertirse a niveles no detectables (negativos) para el séptimo u octavo mes posterior a infección canina experimental aguda o pueden permanecer detectable a niveles bajos durante 7 u 8 meses por lo menos. El diagnóstico de infección por *A. phagocytophilum* pueden requerir pruebas serológicas si no encuentran mórulas en neutrófilos de sangre periférica y si no se dispone de un ensayo de PCR. (Greene, 2008.)

Otro método de prueba de anaplasmosis es la prueba indirecta de IFA, que detecta anticuerpos séricos incluso 7 días después de la infección inicial, a pesar de que es posible que algunos perros se tornen seropositivos hasta 28 días después de que comienza la infección. Por lo tanto, es posible que un perro esté infectado y no presente títulos de anticuerpos a *Anaplasma spp.* Son negativos, se recomienda un examen de seguimiento de 2 a 3 semanas o pruebas séricas en busca de otros

agentes. Los niveles de anticuerpos séricos en perros no tratados llegan a su punto máximo a los 90 días posteriores a la infección. (Greene, 2008.)

Las proteínas de superficie inmunodominantes de similar tamaño molecular provocan reactividad cruzada serológica, en particular las de la familia de las proteínas inmunodominantes de membrana exterior presentes a *Ehrlichia spp.* y *A. phagocytophilum*. Se ha evaluado la reactividad cruzada serológicas entre *A. phagocytophilum* y otros microbios, en especial otros agentes transmitidos por garrapatas. La reactividad serológica cruzada es fuerte entre cepas de *A. phagocytophilum* y agentes de *Ehrlichia*. Y no existe entre *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi*, *Bartonella sp.* o *R. rickettsii*. (Greene, 2008.)

En ocasiones, se ha observado un aumento leve de temperatura rectal durante parasitemias iniciales y se ha reconocido hematoquecia en algunos perros trombocitopénicos. La esplenectomía antes de la infección experimental da como resultado recuentos plaquetarios preinoculación más altos, pero no altera la periodicidad de las parasitemias o la gravedad de la enfermedad. No parece que la edad del animal provoque un efecto significativo. (Greene, 2008.)

En el curso de la infección. En la mayoría de los perros infectados en forma natural, también aparecen signos clínicos leves, pero se han informado signos clínicos más graves, incluso fiebre, uveítis, epistaxis, hemorragias equimóticas y petequias. (Greene, 2008.)

Se han encontrado signos clínicos como fiebre, letargia, mucosas pálidas, hemorragias petequiales de la piel y mucosas orales, disminución del apetito, pérdida de peso, descargas nasales purulentas y linfadenomegalia. (Greene, 2008.)

5.1.6.- HALLAZGOS PATOLÓGICOS EN *A. platys*

El único hallazgo macroscópico en la necropsia fue el agrandamiento generalizado de ganglios linfáticos durante la primera semana de infección. Las lesiones histológicas eran, en general, leves e incluían hiperplasia linfoide y plasmocitosis en los ganglios linfáticos y el bazo, hemorragias perifoliculares con forma de media luna en el bazo e hiperplasia multifocal de células de Kupffer en el hígado. Las cantidades de megacariocitos en la medula ósea son normales o se observaba un aumento. (Greene, 2008.)

6.- TRATAMIENTO

Las pruebas de susceptibilidad de *A. phagocytophilum* muestran que la doxiciclina, rifampicina, y la levofloxacina son más eficaces. Se recomienda en forma casi exclusiva utilizar tetraciclinas para el tratamiento de infecciones por *A. phagocytophilum*. Para cachorros menores de 1 año, puede utilizarse cloranfenicol para evitar los dientes amarillentos. El protocolo de tratamiento recomendado es doxiciclina (5 a 10mg/kg, oral, cada 12 a 24 horas durante 10 días) o tetraciclinas (22 mg/kg, cada 8 horas durante 14 a 21 días). No se ha comprobado que el tratamiento a largo plazo después del intervalo recomendado sea beneficioso porque no existe evidencia de enfermedad crónica. A pesar de que existe evidencia de infecciones subclínicas crónicas en estudios suecos, no se observaron signos clínicos y se desconoce la posibilidad de que los antibióticos eliminen el estado del portador. La mayoría de los perros responden rápidamente al tratamiento y, con frecuencia, son normales desde el punto de vista clínico 24 a 48 horas después del inicio de aquél, pero los dueños informan, que en ocasiones, se necesitan semanas o años para que los animales se recuperen por completo. Deben tratarse de manera apropiada las enfermedades concurrentes. Si la respuesta a antibióticos como tetraciclinas es débil, la probabilidad de que el perro tenga una enfermedad concurrente es alta. (Greene, 2008.)

Actualmente se usan las tetraciclinas e imidocarbamol para el tratamiento. El tratamiento con estos fármacos puede dar resultados de inmunidad hasta ocho meses en casos de anaplasmosis severa. (Davousta y col. 2005).

7.- PREVENCIÓN Y CONTROL

No se dispone de ninguna vacuna para prevenir la infección por *A. phagocytophilum*. La prevención depende de: 1) evitar la exposición a los vectores garrapatas. (*I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus*). Desde la primavera hasta el otoño, 2) el uso profiláctico de acaricidas, y 3) el uso profiláctico de doxiciclina o tetraciclina cuando se visitan regiones endémicas de garrapatas (Greene, 2008.)

Los vectores deberán reducirse. La erradicación puede lograrse al separar los animales infectados, aunque por lo común no es factible. Para que esta enfermedad no sea de riesgo para el hombre es necesario controlar al vector en este caso hacer programas garrapaticidas que pueden ayudar a disminuir el riesgo de infecciones en los caninos. (Comité Editorial, 2000)

8.- CONSIDERACIONES A LA SALUD PÚBLICA

Se informó por primera vez infección humana por *A. phagocytophilum* en 1994 en habitantes de Minnesota y Wisconsin. Desde entonces, se diagnosticaron infecciones humanas en Massachusetts, California, Rhode Island, Connecticut, Nueva York, y Eslovenia. No se distingue enfermedad clínica de la observada con infecciones por *E. chaffensis* y *E. ewingii*, y muchas otras enfermedades infecciosas sistémicas. Los signos clínicos más frecuentes son fiebre, malestar, cefalea y mialgia. Los signos que se presentan con menos frecuencia pero siguen siendo comunes son artralgia, vómitos, diarreas, tos, cuello rígido y confusión. Con poca frecuencia se presenta exantema. Los hallazgos de laboratorio más consistentes son trombocitopenia,

leucopenia y aumento leves en actividades séricas de ALT y aspartato aminotransferasa. (Greene, 2008.)

Se presentan neutrófilos de sangre periférica que contienen mórulas sólo en 80% de los casos y pueden infectarse sólo una pequeña cantidad de neutrófilos, incluso cuando se presentan mórulas. Han muerto pacientes por infección de *A. phagocytophilum*, pero todos a causas de complicaciones relacionadas con infecciones oportunistas. Una pequeña cantidad de los pacientes recuperados se quejan de síntomas persistentes de enfermedad durante 1 a 3 años después del tratamiento. Se desconoce el potencial de riesgo zoonótico de infección humana por *A. phagocytophilum* que pueden presentar los perros, los caballos, las ovejas, y otros animales domésticos. Es probable que los huéspedes de vida salvaje, como los roedores, sean reservorios de mantenimiento, con etapas inmaduras de garrapatas como vectores, es posible que se infecten ciervos o que estén involucrados en el mantenimiento de vectores. (Greene, 2008.)

Los vectores son garrapatas *Ixodes spp*, que también transmiten la *Borrelia spp*, lo que explica la distribución geográfica mundial superpuesta de estas enfermedades. Es posible que las coinfecciones con *Borrelia spp*. y *Ehrlichia spp*. den como resultado enfermedad más grave en huéspedes infectados. Se sospecha que las personas pueden infectarse cuando manejan sangre o carcasas de ciervos o garrapatas infectados ingurgitados. Los individuos afectados habían cortado una gran cantidad de carcasas de ciervos y habían sufrido numerosos cortes durante el proceso. También se utilizó un serrucho eléctrico, que produce partículas de sangre en aerosol. Deben tomarse precauciones cuando se realizan necropsias en animales sospechosos de alojar esta infección. (Greene, 2008.)

Las diversas especies de mamíferos pueden ser atacadas por varias especies de la filia. Ya sea el *Anaplasmataceae* individualmente o en forma conjunta, los veterinarios están aportando información médica comparativa sobre la Ehrlichiosis y

Anaplasmosis discutiendo sus riesgos zoonóticos. Esto hace que las farmacéuticas hagan un doble esfuerzo para desarrollar nuevos garrapaticidas para el control del vector, tanto de Anaplasmosis como con el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas de Bartonelosis canina y humana, enfermedades infecciosas emergentes. En cuanto a la prueba de ELISA tiene como desventaja que se pueden encontrar títulos por debajo del umbral de positividad dando como resultados falsos negativos, esto es debido al período que tardan en aparecer los anticuerpos luego de la infección (varía de 15 a 28 días). (Fernández, 2003)

La Anaplasmosis es la segunda enfermedad más transmitida por garrapatas comunes en U.S.A. y una zoonosis emergente en Asia y Europa. Aunque *A. phagocytophilum* se extiende en muchas especies de animales salvajes o domesticados mamíferos, incluyendo roedores, carnívoros, équidos y rumiantes, el depósito principal en Europa es desconocido. El vector principal es la garrapata de ovejas Europea, *Ixodes ricinus*. (Parola, 2001).

Los seres humanos desarrollan una enfermedad aguda, no específica, caracterizada por fiebre de alto grado ($> 39^{\circ}\text{C}$), escalofríos, mialgias generalizadas, fuerte dolor de cabeza y malestar general, a partir de 5-10 días después de la picadura de la garrapata. Muchos de los pacientes también se quejan de artralgias, anorexia, náuseas y tos no productiva. La letalidad es $<1\%$. *Anaplasma phagocytophila* es también responsable para la ehrlichiosis granulocítica (o, más correctamente, Anaplasmosis granulocítica) en los gatos inmunodeprimidos por la infección concurrente con el virus de la inmunodeficiencia felina, y en caballos, ovejas, vacas y perros. El patógeno se ha informado, si bien en zonas pequeñas, en algunos países del Este y Central de Europa. (Thompson y col. 2001)

9. – OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de *Anaplasma spp.* en perros domésticos del municipio de Tacámbaro Michoacán infestados con garrapatas.

9.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma spp.* en perros domésticos del municipio de Tacámbaro, Michoacán.

Determinar la presencia de mórulas de *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* en células de capa leucoplaquetaria en perros domésticos del municipio de Tacámbaro, Michoacán.

Clasificar a los pacientes positivos por raza y edad.

Determinar los valores de hemograma y química sanguínea en los pacientes positivos a Anaplasmosis canina.

10.- HIPÓTESIS.

La seroprevalencia de Anaplasmosis canina en el municipio de Tacámbaro, Michoacán es alta.

La detección serológica de la Anaplasmosis es más específica que el hallazgo de mórulas en la capa leucoplaquetaria.

11.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Este estudio se realizó por medio del conjunto de la investigación descriptiva y explicativa que tiene la finalidad de clasificar, catalogar o categorizar el objeto y tratar de buscar una explicación del comportamiento de las variables. Se llevó a cabo en el periodo comprendido entre los meses de octubre de 2013 a mayo de 2014, en la ciudad de Tacámbaro, Michoacán, México siendo uno de los 113 municipios que conforman el estado de Michoacán de Ocampo, se localiza al centro del Estado, en las coordenadas 19°14' de latitud norte y 101°28' de longitud oeste, a una altura de 1,640 metros sobre el nivel del mar. Colinda al norte con los municipios de Salvador Escalante, Pátzcuaro, Acuitzio y Madero; al este con los municipios de Madero y Nocupétaro; al sur con los municipios de Nocupétaro y Turicato; al oeste con los municipios de Turicato, Ario y Salvador Escalante. Cuenta con una población al 2010 de 69,955 habitantes. (SEDESOL, 2013). Su hidrografía está constituida por los ríos Tacámbaro, pedernales y frío. El arroyo de apoyo y la laguna de la Magdalena. El clima es tropical y templado con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 1, 451.6 milímetros y temperaturas que oscilan entre 8 a 26.9° centígrados. En el municipio domina el bosque mixto con pino, encino y cedro, el bosque tropical deciduo, con parota, cuéramo, ceiba y huisache y el bosque de coníferas, con pino y oyamel. Su fauna se conforma principalmente de mapaches, tlacuaches, conejos, zorros, gato montés, comadreas, ardillas, cacomiztle, torcaz, chachalaca, faisán y gallina de monte. (Guijosa, 2006.)

La mayoría de los habitantes del municipio de Tacámbaro, originalmente se dedican a la fabricación de productos de madera, al cultivo de caña de azúcar, aguacate y chile así como a las actividades agropecuarias. (Guijosa, 2006.)

El estudio se llevó a cabo en las calles cercanas al centro de Tacámbaro, Michoacán, donde se les pedía permiso a los propietarios de los perros y se les informaba sobre

el trabajo que se estaba realizando, se muestrearon 30 perros en total, tomados al azar pero respetando los siguientes criterios.

- Perros clínicamente sanos
- Perros mayores a año de edad.
- Perros con antecedentes de estar o haber estado infestados con garrapatas duras (*Ixodidae*) en los últimos seis meses.
- Perros que no hayan recibido en los últimos seis meses algún tratamiento específico contra Anaplasmosis canina y/o contra garrapatas duras (*Ixodidae*).

Las muestras sanguíneas se tomaron de sangre periférica por el método de venopunción de la vena cefálica o yugular con previa antisepsia del área y de acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999. De cada ejemplar se colectó 3 mL de sangre, con una jeringa de 3 mL y aguja hipodérmica azul g23-azul-06x25-mm. Posteriormente se vertió (previamente retirando la aguja para evitar la hemólisis) 1mL a un tubo con ácido etil-diamino -tetracético (EDTA) y se mezcló suavemente para impedir la coagulación de la sangre, muestra que nos ayudó a realizar el hemograma, la capa leucoplaquetaria y la prueba de ELISA Canine Snap 4Dx, a continuación los 2 mL restantes se vaciaron en un tubo seco sin anticoagulante (tapa color roja), para el estudio de la química sanguínea; ambos tubos después de 30 minutos se colocaron en una hielera con refrigerante a una temperatura de 2 a 4 °C donde permanecieron ahí, hasta llegar al Laboratorio de Patología Clínica de la Clínica Veterinaria para Perros y Gatos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH en la ciudad de Morelia Michoacán.

Una vez llegada las muestras de los ejemplares seleccionados al laboratorio de Patología Clínica se realizaron 4 procesos para la obtención de resultados que puedan servir como referencia para el interés de este trabajo de la siguiente manera.

En primer lugar se dispuso a preparar los reactivos para las pruebas de ELISA para la búsqueda de la *Anaplasma canina* con un kit especial de diagnóstico llamado “Canine Snap 4Dx” (Laboratorio IDEXX)”, el cual detecta anticuerpos frente a *Anaplasma spp.* y en donde se utilizó parte de la muestra de sangre con anticoagulante (tubo EDTA). Los componentes de la prueba de ELISA son:

1. 1 frasco DE 70 mL de conjugado anti – *D immitis* / *Anaplasma spp.* / *B. burgdorferi* / *E. Canis* / *E. ewingii*: HRPO (conservado con gentamicina y kathon).
2. 2 dispositivos SNAP.
3. Reactivos contenidos en cada dispositivo.
4. .4 mL de Solución de lavado (conservado con kathon)
5. .6 mL de solución de sustrato

Otros componentes:

1. Pipetas de transferencia, tubos de muestra y rejilla de reactivos.

Se realizó la prueba de la siguiente manera:

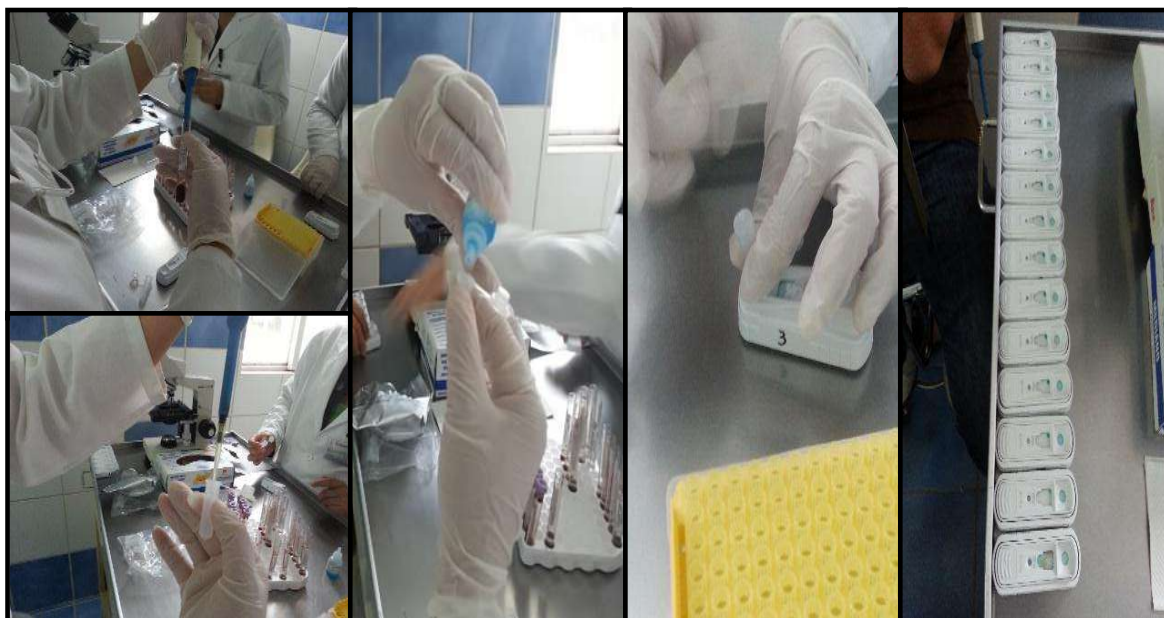


Imagen 3. Realización de las pruebas de ELISA “Canine Snap 4Dx” (Laboratorio IDEXX)” para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma canis* en perros muestreados en la ciudad de Tacámbaro Michoacán (n=30)

1. Con la pipeta del kit se tomó 3 gotas de muestra y se vertió en el tubo muestra (incluida en el kit).
2. Se le agrego 4 gotas de conjugado sosteniéndolo en posición vertical, luego se tapó el tubo muestra y se mezcló invirtiéndolo entre 3 y 5 veces.
3. Se agregó todo el contenido del tubo muestra, en el pocillo de muestra, teniendo cuidado de no verter el contenido fuera de este.
4. La muestra fluyó por la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30 – 60 segundos.
5. Una vez que aparecía color en el círculo de activación, se presionó el activador con firmeza hasta que quedó al ras con el cuerpo del dispositivo.
6. Los resultados aparecieron en los 8 a 10 minutos correspondientes.

En este proceso, si la prueba se tornaba positiva, se le realizaba un estudio de química sanguínea y hemograma, con su respectiva capa leucoplaquetaria a la muestra correspondiente. Se utilizó una bitácora donde se recopilaron los resultados, se pasaban en computadora, (Excel de hoja de cálculo) para su procesamiento y análisis. A las muestras que eran negativas, solo se les realizo capa leucoplaquetaria.



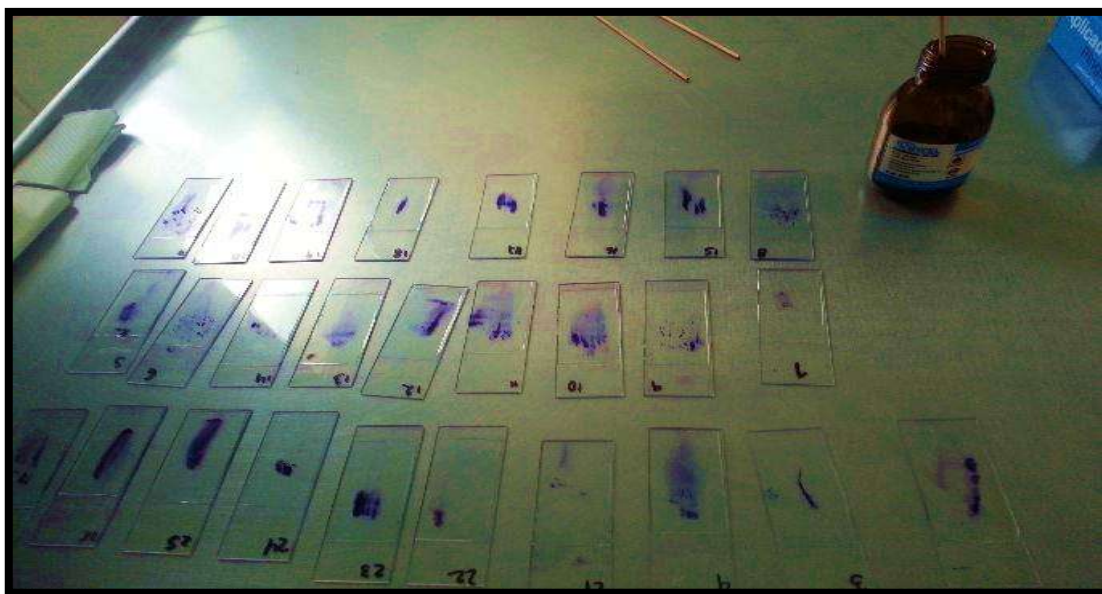
Imagen 4. Muestra de posibles positivos en el test de ELISA Canine Snap 4Dx.

Para la realización de la química sanguínea se utilizó el suero obtenido de la sangre anticoagulada y se determinaron los valores de los analitos en un espectrofotómetro automatizado para química sanguínea, modelo ES-218 Kontrolab, DESEGO).

La realización de las capas leucoplaquetarias se llevó a cabo en las 30 muestras. Y bajo el siguiente procedimiento:

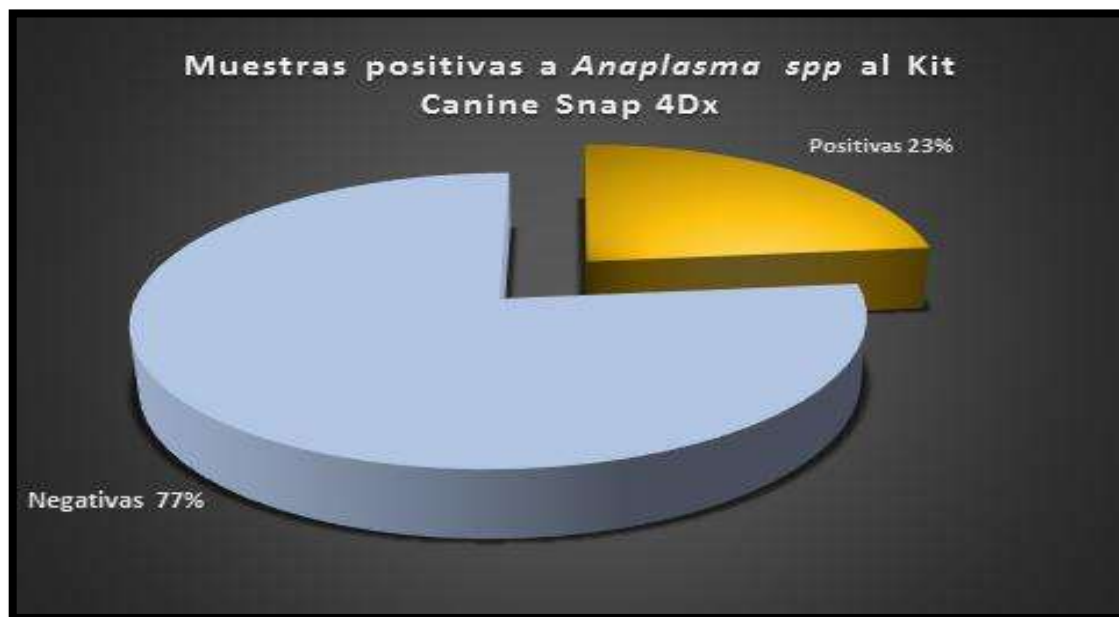
1. La capa leucoplaquetaria se encuentra en el tubo capilar al centrifugarse.
2. Una vez tomada el resultado del hematocrito, se rompió el capilar a modo que quedara la capa leucoplaquetaria expuesta y se realizaba un frotis por barrido en el portaobjetos.
3. Se dejaba secar unos minutos.
4. Se tiñó con tinción de Diff-Quik (hemocolorante rápido).
5. Una vez teñidas las capas leucoplaquetarias se les aplico bálsamo de Canadá para montarlas con cubreobjetos.
6. Una vez secas se observaron en el microscopio compuesto y se observó para investigar la presencia de las mórulas intracelulares características de la enfermedad.

Imagen 5. Capas leucoplaquetarias de los 30 perros muestreados en el municipio de Tacámbaro Michoacán con el fin de observar mórulas de Anaplasma canina



12.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la prueba de ELISA “Canine Snap 4Dx” (Laboratorio IDEXX)”, que actúa para la detección cualitativa de anticuerpos contra *Anaplasma spp*, se utilizó suero sanguíneo, obteniendo una seroprevalencia del 23% (7 animales positivos).



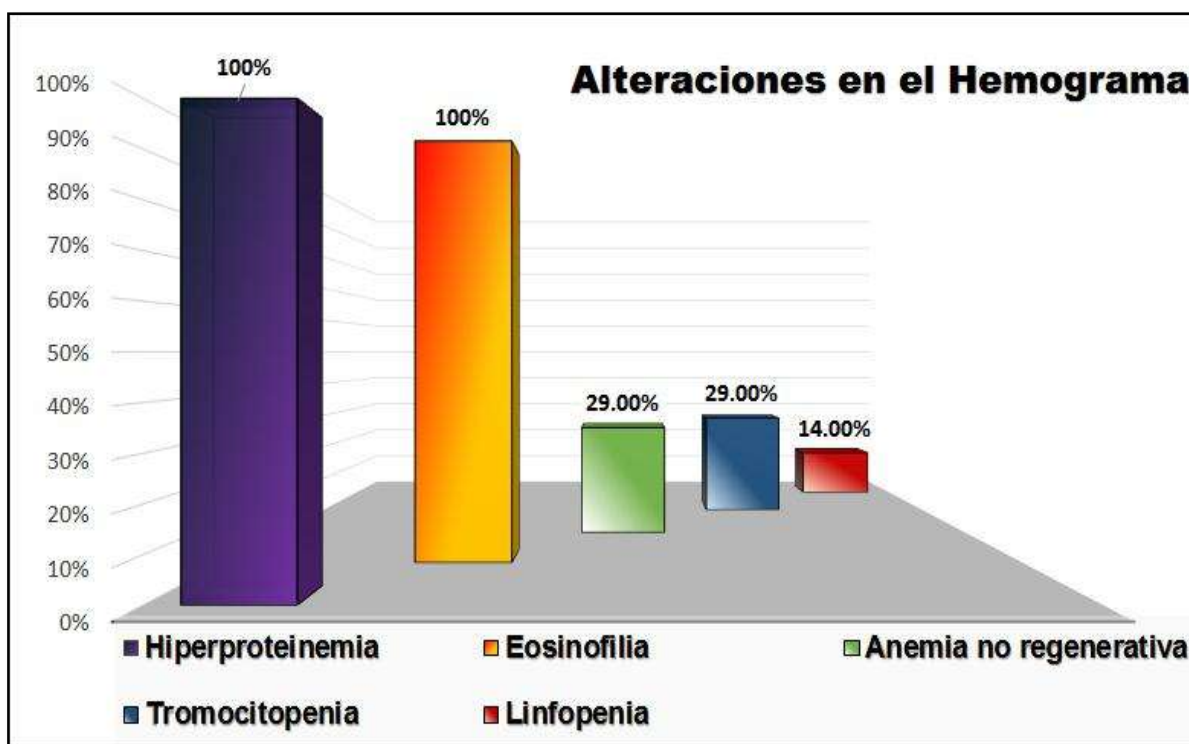
Gráfica1. Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma spp*. En perros muestreados en la ciudad de Tacámbaro Michoacán (n=30)

La prueba de Elisa (Kit 4 DX), detecta la presencia de anticuerpos contra antígenos de *Anaplasma spp*. por lo cual es de utilidad en todas las fases de la enfermedad.

Se requiere un tiempo mínimo de alimentación de 24 horas e inclusión de 48 horas o más para que las garrapatas *Ixodes spp* transmitan *A. phagocytophilum* al huésped mamífero susceptible. El período de incubación de la enfermedad después de una mordedura de garrapata es de 1 a 2 semanas. (Greene, 2008.). Sin embargo, la prueba de ELISA tiene como desventaja que se pueden encontrar títulos por debajo del umbral de positividad dando como resultados falsos negativos, esto es debido al período que tardan en aparecer los anticuerpos luego de la infección (varía de 15 a 28 días). (Fernández, 2003)

Después de haber obtenido estos resultados; a los 7 animales positivos al kit Canine Snap 4Dx se les realizó hemograma y química sanguínea para encontrar algunas alteraciones hematológicas que puedan ser referencia para la Anaplasmosis canina, ya que en estudios realizados en otros países nos sugieren que las anomalías hematológicas más comunes son: tiempos de coagulación incrementados, neutropenia. (Quinn, 2002), anemia no regenerativa, trombocitopenia y leucopenia.

En este estudio, se encontró en el hemograma que el 100% de los animales presentaron hiperproteinemia y eosinofilia, el 29% tuvieron anemia no regenerativa, el 29% trombocitopenia y el 14% linfopenia como se muestra en la gráfica siguiente.



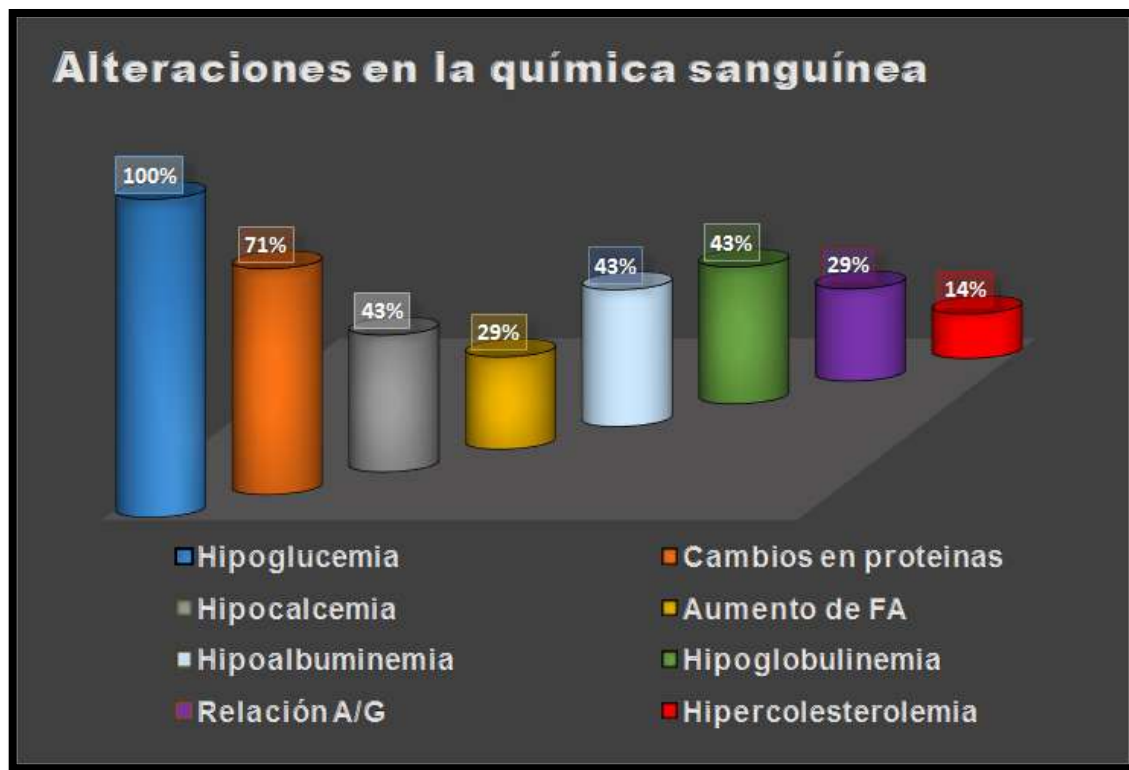
Gráfica 2. Alteraciones hematológicas más frecuentes en perros con títulos de anticuerpos contra a *Anaplasma spp.* muestrados en el municipio de Tacámbaro Michoacán (n=7)

La hiperproteinemia se presenta comúnmente en estos pacientes debido al proceso inflamatorio crónico que ellos presentan, este tipo de proteínas son principalmente globulinas, como se verá en la descripción de la química sanguínea. En cuanto a la

eosinofilia esta es común en casos de parasitosis, alergias o destrucción tisular, sin embargo, nosotros la relacionamos más a las dermatopatías causadas por la presencia de los ectoparásitos (garrapatas) que presentan constantemente estos animales. La anemia no regenerativa se presenta principalmente en pacientes con inflamación crónica y esta reportado en la literatura en Ehrlichiosis y Anaplasmosis subclínicas, se dice que esta anemia es ligera a moderada. En cuanto a la trombocitopenia en el caso de anaplasmosis se presenta por dos mecanismos, si el animal está infectado con *Anaplasma platys*, este agente es intracelular en las plaquetas por lo tanto pueden ser destruidas por el sistema inmune al estar infectadas, en el caso de *Anaplasma phagocytophilum* se ha reportado principalmente hipoplasia medular por lo que en este caso puede deberse a disminución en su producción; cabe recalcar que en las revisiones de los frotis de capa leucoplaquetaria se observó la presencia de *Anaplasma platys* en el 100% de los animales muestreados y en ninguno se observaron mórula de *Anaplasma phagocytophilum*. Pocos pacientes (14%) presentaron linfopenia, está se asocia al estrés crónico que presentaron los animales. (Sosa, 2011.)

La pancitopenia es producida por hipoplasia de células precursoras en la médula ósea y ocurre en fase crónica grave (Heikkilä, 2010). Dentro de las anormalidades químicas de suero sanguíneo se encuentra la hiperproteinemia siendo el resultado de niveles elevados de la globulina, pero no existe ninguna correlación directa los niveles de globulina sérica y anticuerpos séricos contra *Anaplasma spp*, también se presenta hipoalbuminemia, y actividad elevada de la ALT (Alanina aminotransferasa) y FA (fosfatasa alcalina). (Neer, 1995).

En la bioquímica sanguínea se encontró que el 100% de los perros presentaron hipoglucemia, el 71% hiperproteinemia, el 43% hipoalbuminemia, el 43% hiperglobulinemia, 29% disminución de la relación A/G, el 43% hipocalcemia, el 29% presentaron un aumento de FA, y por último el 14% hipercolesterolemia. (Gráfica 3.)

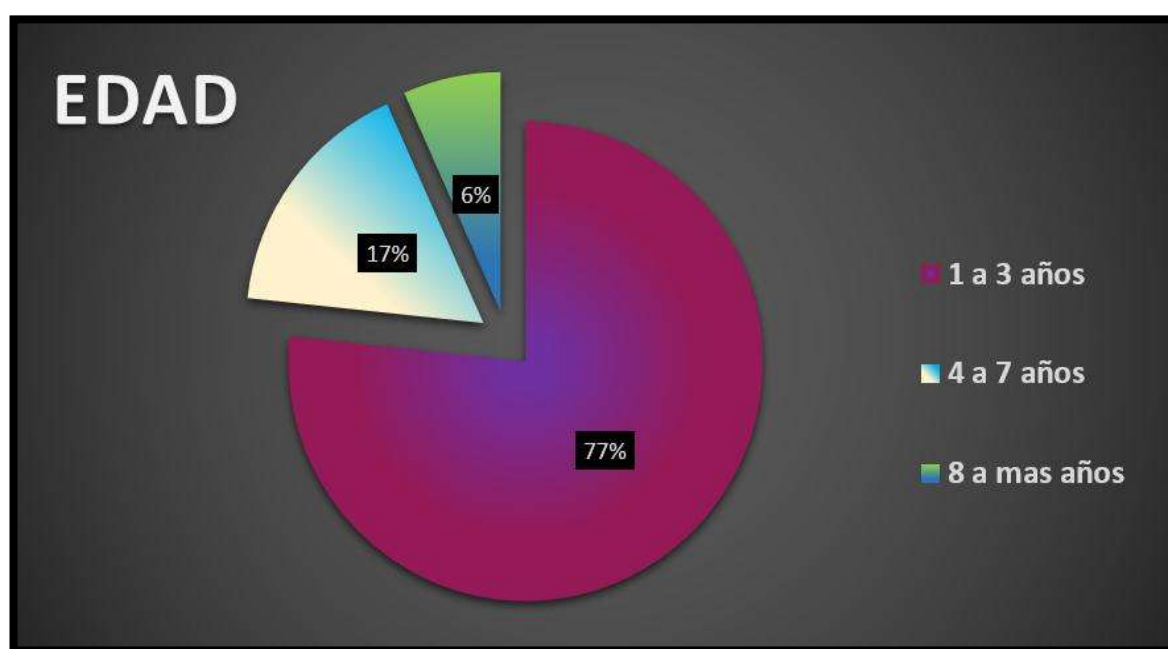


Gráfica 3. Alteraciones en la química sanguínea más frecuentes en perros con títulos contra *Anaplasma platys* muestreados en el municipio de Tacámbaro Michoacán (n=7)

La hipoglucemia presentada en nuestros animales es de origen *in vitro*, ya que los sueros no fueron separados del coágulo en las primeras horas, sino hasta su llegada al laboratorio en la ciudad de Morelia, está bien descrito en la literatura este efecto de consumo *in vitro* de la glucosa. Se mencionó anteriormente la hiperproteinemia debido a hiperglobulinemia por inflamación crónica, al haber disminución en la síntesis de albúmina por parte del hígado, ya que comienza a producir mayor cantidad de globulinas para el proceso inflamatorio, esto nos conlleva a una disminución en la relación A/G. El aumento de FA presentado en el 29% de los pacientes puede ser principalmente de origen esteroideo, lo cual se correlaciona con la linfopenia demostrada en el hemograma y todo esto debido al efecto del cortisol en los componentes sanguíneos. La hipercolesterolemia en este caso puede ser transitoria y la hipocalcemia sólo un artefacto de la hipoalbuminemia, lo cual está relacionado a la ionización de este con la albúmina. Greene, 2008. Menciona que se han reportado casos donde el 90% de los perros presentan linfopenia, y el 50%

presentan anemias normocítica normocrómica no regenerativa leve a moderada. Se ha registrado proteinuria significativa, el 50% de los perros presentan hipoalbuminemia leve a moderada. La actividad de las FA sérica se ve aumentada en un 65% o más, también se documenta la proteinuria.

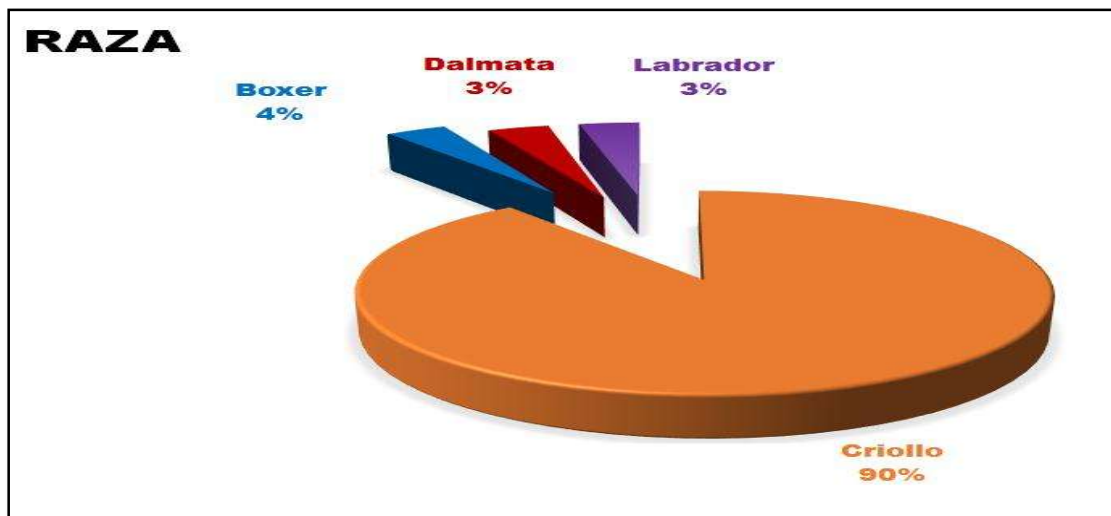
De los 7 perros positivos en la prueba de ELISA Canine Snap 4Dx, el 77% tenían de 1 a 3 años de edad, el 17% entre 4 a 7 años y el 6% de 8 a más años de edad, como se observa en la gráfica 4.



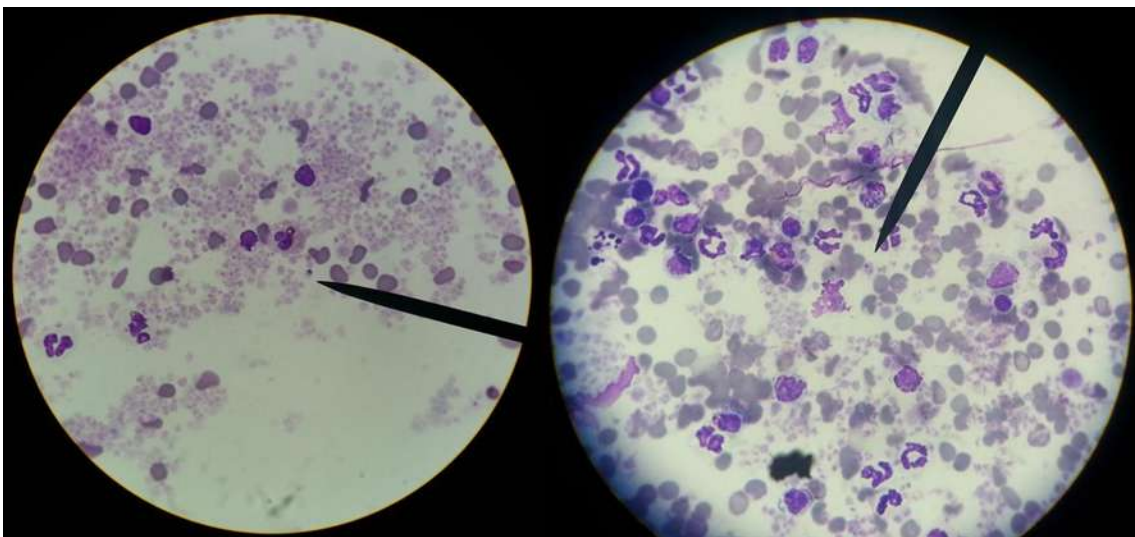
Gráfica 4. Rango de edad con mayor prevalencia de anticuerpos contra a *Anaplasma phagocytophilum* de perros Muestreados en el municipio de Tacámbaro Michoacán. (n=7)

Aunque en el futuro podría haber predisposición de una raza, ya que en estudios realizados en Minnesota, Wisconsin y Suecia, se observó que el más alto porcentaje eran para las razas Labrador y Golden retrievers. (Greene, 2008.) En el estudio realizado, la raza que resultó con mayor porcentaje fue la criolla dando positivos a la prueba de Anaplasmosis canina con el 90%.

Gráfica 5. Razas más afectadas con títulos de anticuerpos contra *Anaplasma spp.* de perros Muestreados en el municipio de Tacámbaro Michoacán. (n=7)

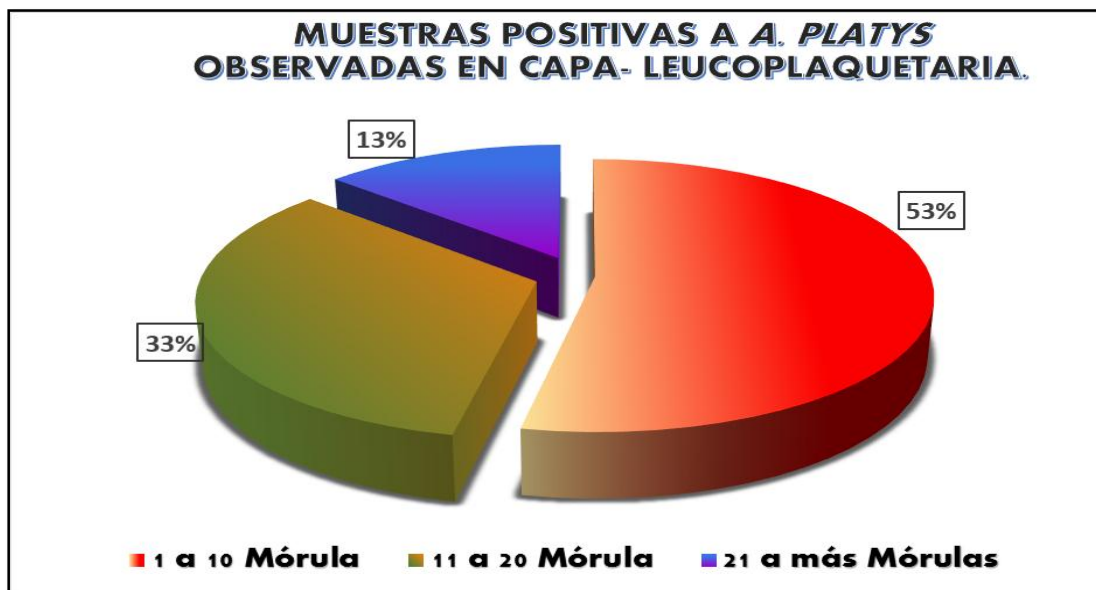


Después de obtener de los resultados en la prueba rápida de ELISA, se elaboraron las capas leucoplaquetarias de las 30 muestras, con la finalidad de evaluar al microscopio mediante la observación la presencia de mórulas de *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*. Se observó que, todas la muestras fueron positivas a *Anaplasma platys*.



Imágenes 6 y 7. *Anaplasma Platys* encontradas en los perros muestreados en la ciudad de Tacámbaro Michoacán (n=30) visto con lente de inmersión

Una vez identificadas las mórulas de *A. platys* se realizó un conteo por cada muestra donde se obtuvieron los siguientes resultados. De las 30 muestras el 53% se encontraron de 1 a 10 mórulas en la observación de la capa leucoplaquetaria, el 33% se encontraron de 11 a 20 mórulas y el 13% restante se encontraron de 21 a más mórulas de *Anaplasma platys*.



Gráfica 6. Cantidad de mórulas de *Anaplasma platys* en capas leucoplaquetarias de los perros muestreados en la ciudad de Tacámbaro Michoacán (n=30)

13.- CONCLUSIÓN.

Al concluir este trabajo de investigación realizado en el municipio de Tacámbaro Michoacán, México, se determinó que si existe una seroprevalencia alta de Anaplasmosis canina en dicho municipio. Ya que los resultados del análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) se encontró que la prevalencia fue del 23% sin embargo, al observar las capas leucoplaquetarias en el microscopio se demostró que todas las muestras fueron positivas frente a *Anaplasma platys*. Debido a que la prueba de ELISA es basada en una enzima, para determinar la presencia de anticuerpos de *Anaplasma spp.*, cuando los títulos de anticuerpos están debajo del umbral de positividad da como resultado negativo ya que los anticuerpos pueden tardar de 1 a 28 días después de la infección inicial según el tipo de infección correspondiente a la *Anaplasma spp.*, por este motivo se recomienda realizar también la capa leucoplaquetaria para asegurar la existencia o no de la enfermedad en donde por medio de la observación se pueden ver las mórulas tanto de *A. platys* como de *A. phagocytophilum* respectivamente.

En cuanto a la predisposición por edad se obtuvo que la prevalencia más alta fue del 77% en perros que tienen entre 1 a 3 años de edad. Sin embargo en otros estudios nos dice que no existe actualmente la predisposición de la enfermedad en la raza o en el sexo.

Gracias a que la mayoría de los estudios sobre la prevalencia de *Anaplasma* canina son llevados a cabo en zonas geográficas reducidas en otros países que tienen las mismas características de algunas regiones tropicales y subtropicales de México entre ellos Michoacán es importante que se mantenga un control preventivo para la transmisión y desarrollo de la enfermedad basándose en el ciclo de vital de la garrapata *Ixodes* por medio de protocolos de desparasitación. Ya que al ser una enfermedad zoonótica es de gran importancia evitar la diseminación de la enfermedad.

14.- BIBLIOGRAFÍA

1. DeCS. [En línea]. Descriptores en Ciencias de la Salud Biblioteca Virtual. // [Consulta: el 3 de mayo 2013].
2. Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Bakken, J.S.; Walker, D.H.; 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease, pp. 589 - 595.
3. Greene C. 2008. "Enfermedades infecciosas, perros y gatos" Tercera Edición Volumen 1. Cap. 28 "Ehrlichiosis, neorickettsiosis, anaplasmosis e infección por Wolbachia" pp.: 227 – 259.
4. Carter, G.R; Chengappa, M.M; 1994. "Bacteriología y micología veterinaria". Ed. Manual Moderno. pp. 423 – 424.
5. Sosa, O.; Miledys.; 2011. "Tesis doctoral". "Evaluación de la hemostasia en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con una cepa de *Anaplasma platys*". Maracay, Universidad central de Venezuela Facultad de ciencias Veterinarias, Posgrado de Medicina Veterinaria.
6. Arraga, C.M.; 2001. "Manual de Laboratorio". "Diagnóstico de agentes hemotrópicos mediante la utilización de frotis de capa blanca". Taller de Laboratorio en Agentes Hemotrópicos. Caracas 12 de mayo. Venezuela-SOVEMEVEPA.
7. Dwight, D.; Bowman, M.S.; 2011. "Parasitología para veterinarios" ed. Elsevier.

8. Dumler, J.S.; 2005. "Rikihisa Y, Dasch A. Family *Anaplasmataceae*". Genus I. *Anaplasma*. En: "The Proteobacteria Part C, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Segunda edición; Volumen 2; editorial Springer. p117. New York, EUA.
9. Mujica, R.; 2005. [En línea] "Ehrlichiosis y Anaplasmosis canina". Es.escrib.com. [Consulta: 18 septiembre, 2013].
10. Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dash, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisha, y. and Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51 (pt6), 2145 – 2165.
11. Strik, N.I.; Aleman, A.R.; Barbet, A.F.; Sorenson, H.L.; Wamsley, H.L.; Gaschen, F.P.; 2007. "Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross reactivity with *Anaplasma marginale*". *Clinic Vaccine Immunol*, pp.14-23. 262-268.
12. Foley, J.E.; Foley, P.; Madigan, J.E.; 2001. "Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California".; *Am J Vet Res*, pp. 62.1599-1605.
13. Preziosi, D.E.; Cohn, L.A.; 2002. "The increasingly complicated story of Ehrlichia".; *Compend Contin Educ Pract Vet*, pp. 24. 277-288.
14. Fernández, S.P.; 2003. [Tesis Doctoral] [En línea] "Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su

- parasitismo y detección molécula de los patógenos que albergan". Universidad de Salamanca; facultad de biología. España. [consulta el 12 de julio 2013]
15. Huang, H.; Unver, A.; Pérez, M.J.; Orellana, N.G.; 2005. "Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela". [Artículo pdf]
16. Comité Editorial, 2000. "El manual Merck de Veterinaria"; Quinta edición.; Editorial océano grupo editorial S.A.; Barcelona, España.; pp. 23, 24,25.
17. Quinn, P.J. 2002. "Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias". Ed. Acribia S, A. pp. 35
18. Heikkilä, H.; Bondarenko, A.; Mihalkov, A.; Pfister, K.; Spillmann. 2010. "Anaplasma phagocytophilum infección in a domestic cat in Finland": Case report . T. Acta Vet Scand. [Artículo pdf.]
19. Davoust, A.; Keundjian, V.; Rousc, L.; Maurizid, D.; 2005. "Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline B". Microbiology. 2005.
20. Parola, P.; Raoult, D. 2001. "Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe". *Clinical Microbiology and Infection*. p.7, 80–83.
21. Thompson, C.; Spielman, A.; Krause, P.J. 2001. "Coinfecting deer associated zoonoses: Lyme disease, babesiosis, and ehrlichiosis". *Clinical Infectious Diseases* p. 33, 676–685.
22. Neer, T.M.; 1995. [en línea] "Unpublissed data. Louisiana State University, Baton Rouge, LA". [14 de mayo de 2013]

23. SEDESSOL Datos de Tacámbaro. [línea] [consulta 15 de junio 2013]

24. Guijosa, J.J. 2006. [En línea] "Proyecto de investigación para el establecimiento de una granja cunícola para la producir carne en el municipio de Tacámbaro, Michoacán". Servicio profesional. [consulta el 28 de Junio 2013]