

Tesis de Grado Maestría Biotecnología y Biología Molecular

**Implementación de PCR Múltiplex Punto Final y Simplex tiempo real para la
Detección de *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis***

Estudiante: Danny Chinchilla Cárdenas

Director: Reinaldo Gutiérrez Marín

Co director: Alberto Mendoza

Asesora: Lyda Raquel Castro

Línea de Investigación: Ciencias Biomédicas

Grupo de Investigación: GIEPATRI

Fuente de Financiación: Empresa Privada

Institución: Universidad de Pamplona

Pamplona, Norte de Santander, 17 de Julio de 2019

Tabla de Contenido

1. Resumen.....	5
2. Palabras Claves.....	5
3. Introducción.....	5
4. Justificación	8
5. Pregunta de Investigación	9
6. Objetivos generales y específicos.....	10
6.1 Objetivos generales	
6.2 Objetivos Específicos	
7. Marco teórico	10
7.1 <i>Ehrlichia</i>	
7.1.1 Epidemiología	
7.1.2 Manifestaciones Clínicas	
7.1.3 Transmisión	
7.1.4 Diagnóstico	
7.2 <i>Hepatozoon canis</i>	
7.2.1 Epidemiología	
7.2.2 Manifestaciones Clínicas	
7.2.3 Transmisión	
7.2.4 Diagnóstico	
8. Variables	25
9. Diseño metodológico: tipo de estudio, muestra, población, unidades de estudio. Descripción de los procedimientos a seguir. Análisis de los datos generados en términos estadísticos.	26
9.1 Tipo de Estudio	
9.2 Unidades de estudio	
9.3 Materiales y Métodos.....	26
9.3.1 Modelo de referencia de extracción de ADN por Salting out.	
9.3.2 Protocolo extracción de ADN por Salting out modificado.	
9.3.3 Protocolo de Extracción de ADN por Kit DNA isolation DNaeasy Blood & Tissue – Qiagen	
9.3.4 Diseño Primers – Sonda <i>Hepatozoon canis</i> - <i>Ehrlichia sp</i> - Control Interno Gadph	
9.3.5 Validación de la PCR simplex tiempo real y múltiplex punto final	

9.3.6	Protocolo PCR <i>Hepatozoon canis</i> , - <i>Ehrlichia sp</i> - Control Interno Gadph con Top Taq polimerasa Qiagen.	
9.3.6.1	Condiciones del Termociclador Simplyamp Applied biosystem de Thermofisher	
9.3.7	Protocolo qPCR <i>H. canis</i> - <i>Ehrlichia sp</i> - Control Interno Gadph con Quantinova Syber Grenn I Qiagen	
9.3.7.1	Condiciones del Termociclador Rotor Gene 2 plex + HRM Qiagen	
9.3.8	Protocolo qPCR <i>H. canis</i> - <i>Ehrlichia sp</i> - Control Interno Gadph con Quantinova Probe Qiagen	
9.3.8.1	Condiciones del Termociclador Rotor Gene 2 plex + HRM Qiagen	
9.4	Secuenciación de Fragmentos	30
10.	Consideraciones éticas del proyecto.....	31
11.	Resultados	31
11.1	Cuantificaciones Salting out modificado	
11.2	Cuantificaciones KIT DNA Isolation DNeasy Blood & Tissue Qiagen	
11.3	Criterios de aceptación de DNA Extraído	
11.3.1	Diseño Primers – Sonda <i>H. canis</i> - <i>Ehrlichia sp</i> - Control Interno Gadph	
11.3.2	Blast general	
11.3.3	Oligo Analyzer Primers – Sonda	
11.4	Reportes Gel de Agarosa PCR <i>H. canis</i> protocolo Top Taq Polimerasa Qiagen	
11.5	Reportes Gel de Agarosa PCR <i>Ehrlichia sp</i> protocolo Top Taq Polimerasa Qiagen	
11.6	Reportes Gel de Agarosa PCR múltiplex <i>H. canis</i> – <i>Ehrlichia sp</i> protocolo Top Taq Polimerasa Qiagen	

11.7	Reportes Gel de Agarosa PCR Control interno Gadph protocolo Top Taq Polimerasa Qiagen	
11.8	Reportes Curva Melting <i>Ehrlichia sp</i> protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen	
11.8.1	Comparación tm con uMelt	
11.9	Reportes Curva Melting <i>H. canis</i> protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen	
11.9.1	Comparación tm con uMelt	
11.10	Reportes Curva Melting control interno Gadph protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen	
11.10.1	Comparación tm con uMelt	
11.11	Reportes qPCR <i>H. canis</i> protocolo Quantinova probe de Qiagen	
11.12	Reportes qPCR <i>Ehrlichia sp</i> protocolo Quantinova probe de Qiagen	
11.13	Reportes qPCR Control intentro Gadph protocolo Quantinova probe de Qiagen	
11.14	Secuenciación de Fragmentos.....	41
11.14.1	Secuenciación <i>Ehrlichia sp</i>	
11.14.1.1	Blast de la secuenciación <i>Ehrlichia sp</i>	
11.14.2	Secuenciación <i>H. canis</i>	
11.14.2.1	Blast de la secuenciación <i>H. canis</i>	
12.	Discusión	42
13.	Conclusiones	45
14.	Recomendaciones.....	46
15.	Anexos	46
16	Bibliografía	86

1. Resumen de Proyecto

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores se realiza de manera rutinaria a través de pruebas serológicas, específicamente pruebas rápidas, incluso en algunos casos se llega a emplear pruebas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) cuantificando títulos de IgG que podrían ser de memoria inmunológica en el caso de *Ehrlichia*, situación que da posibles falsos positivos (Morales et al, 2015), además del costo elevado. Por otro lado, el diagnóstico de *Hepatozoon canis* solo se realiza mediante extendidos de sangre periférica, técnica dispendiosa y poco confiable debido a la baja probabilidad de encontrar gametocitos en campos microscópicos en parasitemias bajas (Otranto et al, 2011), es por ello que se desarrolló una técnica de diagnóstico molecular directa altamente sensible y económicamente viable que detecte simultáneamente los dos patógenos más frecuentes en la clínica diaria, las cuales representan gran amenaza contra la vida de las mascotas. Siendo los Hemoparasitos con mayor presencia en Norte de Santander según reporta el Laboratorio MASCOLAB. Por ende se diseñaron por bioinformática, primers específicos que se unen a regiones altamente conservadas de los patógenos en estudio, para luego validar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) según los estándares de Información mínima para experimentos de cuantificación (MIQE) (Bustin et al, 2010), tomando como referencia la tecnología PCR tiempo real cuantitativa, diseñando Sondas de Hibridación. Se tomaron pacientes positivos presuntivamente a *Ehrlichia sp*, y *Hepatozoon canis* por extendido de sangre periférica provenientes del área metropolitana de Cúcuta, diagnosticados en el Laboratorio MASCOLAB, a los cuales se les realizó la extracción de ácido dexoxirribonucleico (ADN) por métodos *Salting out*, y posterior a ello se les realizó la PCR múltiplex punto final y PCR simplex tiempo real sonda taqman para *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis*.

El diseño experimental se ensayó con diferentes protocolos de PCR (Top Taq polimerasa Qiagen, Quantinova Syber green Qiagen y Quantinova probe Qiagen, se diseñaron controles internos de amplificación, secuenciación de fragmentos. Se logro amplificar los fragmentos deseados confirmados por secuenciación, obteniendo la PCR múltiplex de detección simultanea de *H. canis* y *Ehrlichia sp*. asi mismo, se logro validar el método de extracción de ADN por salting out modificado.

2. Palabras claves

PCR multiplex punto final, PCR tiempo real sonda taqman, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia sp*

3. Introducción

La Ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad causada por la bacteria *Ehrlichia canis*, transmitida por garrapatas como *Rhipicephalus sanguineus*, descubierta por primera vez en Argelia en 1935 por Donatien y Lestoquard, localizada principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Dolz et al, 2013), es un cocobacilo Gram negativo intracelular obligado, presentándose particularmente como mórulas dentro de células derivadas de médula ósea de caninos como monocitos, neutrófilos y linfocitos (Nakaghi et al, 2008). Se consideraba exclusiva de caninos, pero recientemente se ha detectado en humanos con y sin síntomas (Perez et al, 1996). Además de la *Ehrlichia canis* existen otras especies que pueden

llegar a afectar los humanos, tales como, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium* y *Ehrlichia muris* (Olano et al, 2004), considerándose una enfermedad zoonótica debido al contacto directo y constante de humanos hacia los animales de compañía portadores del vector *Rhipicephalus sanguineus*.

La Ehrlichiosis monocítica se manifiesta en perros con síntomas como fiebre, depresión, anorexia, hepato – esplenomegalia, linfadenopatía, dificultad respiratoria, cardíaca, y alteraciones oculares en la fase aguda (Breitschwerdt et al, 1998; Castro et al, 2004; Nakaghi et al, 2008). Los hallazgos clásicos del laboratorio son: trombocitopenia, leucopenia, anemia ligera, característico de una hipoplasia medular. La fase crónica se caracteriza por hemorragia, epistaxis y edema (Harrus et al, 1999).

En Colombia hasta el 2012 fué por primera vez caracterizada mediante técnicas moleculares, antes detectándose solo por presencia de anticuerpos de *Ehrlichia sp* (Hernandez et al, 2012). Las herramientas de diagnóstico actualmente disponibles son; la serología (Inmunofluorescencia indirecta, e inmunocromatografía), análisis de capa leucocitaria, cultivo celular, y PCR (aunque no se encuentra disponible en todos los laboratorios), siendo la inmunofluorescencia indirecta la técnica más usada para el diagnóstico de Ehrlichiosis durante más de 30 años fue la prueba “gold estándar” (Ristic, 1972), aunque una de las desventajas es la reactividad cruzada con otras especies de *Ehrlichia sp* debido a que la proteína de membrana externa (OMP) de 30kD es compartida con *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia platys* (Waner et al, 2001). Por tanto, la interpretación de los títulos mayor o igual a 1:64 se considera que el paciente estuvo expuesto al patógeno (Olano et al, 2003), y los títulos mayores o igual a 1:256 se podría considerar como probable infección, por tanto siempre será necesario confirmar con pruebas moleculares, asociando con los síntomas del paciente (Waner et al, 2001).

Implementando estas técnicas moleculares como la PCR en el diagnóstico veterinario, se incrementaría la sensibilidad y especificidad, amplificando genes altamente conservados de *Ehrlichia sp* de manera directa (Nakaghi et al, 2008).

Debido a la reactividad cruzada con diferentes especies de *Ehrlichia* y la deficiente interpretación de títulos de anticuerpos IgG, se pretende incrementar la sensibilidad y especificidad en cuanto a la detección de dichos agentes con técnicas moleculares como la PCR múltiple punto final y PCR tiempo real sonda taqman, realizando alineamiento múltiple para todas las especies de *Ehrlichia sp*, lo cual hace que la técnica descarte posibles contactos como lo muestra la inmunofluorescencia indirecta. No obstante, la presencia de *Ehrlichia sp* circulante en sangre periférica determinada por PCR indicaría que el paciente presenta actualmente la infección. Aunque es de resaltar que un contacto con la garrapata infectada en menos 24 horas podría la prueba dar positivo a PCR si se toma en este lapso de tiempo, sin embargo, es necesario repetirla en los próximos tres días, debido a que la respuesta inmune del paciente podría actuar y eliminar el patógeno de circulación. Así mismo, no siempre que existan un contacto con el vector significa que hay enfermedad, debido a que existen tres barreras principales de protección contra patógenos que son; el sistema complemento, la inmunidad adquirida, y la respuesta inmune celular, las cuales se encargan de opsonizar patógenos circulantes, por tanto, la PCR daría negativo, no obstante,

se hace necesario el empleo de esta prueba para descartar este tipo de situación.

Ahora bien, otro de los patógenos que son emergentes en el departamento de Norte de Santander es *Hepatozoon canis* el cual se transmite vía oral, es decir una vez ingerida la garrapata, la posibilidad de infectarse el canino es muy alta.

Hepatozoon canis es un protozoo clasificado en el *phylum* apicomplexa, transmitido por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* que es el principal vector, cuyo ciclo biológico cumple con el supuesto de que el canino debe ingerir la garrapata con oocistos maduros para infectarse (Baneth et al, 2001). La hepatozoonosis puede atacar tanto a vertebrados como invertebrados cuyo agente causal puede ser *H. canis* o *H. americaninum*, siendo esta última más común en Norte América (Little et al, 2009). *Hepatozoon canis* fue descubierto por primera vez en la India en 1905, está distribuido en Europa, Asia (Rajamanickam et al, 1985; Murata et al, 1993), Africa (McCully et al, 1975; Ezekoli et al, 1983), Sur America (O'Dwyer et al, 2001), Argentina (Eiras et al, 2007), y Venezuela (Criado-Fornelio et al, 2007). En Colombia fue por primera vez caracterizado en el 2012 mediante técnicas moleculares (Hernandez et al, 2011), antes reportado en extendido de sangre periférica (Ardila et al, 2007). Dentro de las técnicas empleadas para el diagnóstico se encuentra el extendido de sangre periférica, acompañado de la tinción de la capa leucocitaria que detectan los gametocitos intraleucocitarios, la serología (actualmente no disponible) e histopatología, además de la PCR que presenta mayor sensibilidad y especificidad a la hora de realizar el diagnóstico definitivo (Oyamada et al, 2005). Este protozoo causa infecciones crónicas leves en los hospederos, pero también puede llegar a producir manifestaciones clínicas severas como letargia, fiebre anorexia, pérdida de peso, linfadenomegalia y anemia los cuales están asociados a altas cargas parasitarias. (Otranto et al, 2011). Presentando coinfecciones con *E.canis* (Baneth et al, 1997), *Babesia* sp. debido a la exposición con el vector (Sasanelli et al, 2009), incluso con *Leishmania infantum* (Otranto et al, 2010).

El vector asociado a ambos patógenos en estudio es el *Rhipicephalus sanguineus* conocida como garrapata marrón del canino pertenece a suborden Ixodida, *phylum* Artropoda, es el principal responsable de la transmisión de diversos patógenos (Virus, Bacterias, helmintos, protozoos) a perros convirtiéndose en el vector más importante en medicina veterinaria de pequeñas especies, logrando transmitir patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Leishmania infantum*, *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys*, *Babesia caballii*, *Babesia gibsoni*, *Cercopithifilaria grassi*, *Coxiella burnetii*, *Dipetalonema dracunculoides*, *Hepatozoon canis*, *Mycoplasma haemocanis*, *Rangelia vitalli*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Theileria equi* (Dantas et al, 2008)

Dentro de las técnicas de laboratorio empleadas para el diagnóstico de estos patógenos se encuentra la PCR cuya sensibilidad y especificidad dependen del diseño de primers o secuencias iniciadoras de la reacción, siendo claves para la detección del gen en particular, específico de la especie o genero en cuestión, sin embargo en la investigación se realizaron alineamientos múltiples para las diferentes especies de *Ehrlichia sp*, y solo especies de *Hepatozoon canis* el cual solo ha reportado esta única especie en Colombia

Partiendo de esta premisa, una de las variantes de la PCR es la Múltiple (PCRm), en donde la reacción se lleva a cabo con dos pares de primers, que en teoría se unen a dos secuencias

totalmente diferentes, identificando dos patógenos al tiempo. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1988 por Chamberlain y colaboradores con el objetivo de amplificar locis múltiples del gen de la distrofia muscular en humanos, otras de sus aplicaciones ha sido la detección de deleciones, mutaciones, polimorfismos, y análisis cuantitativo por retrotranscriptasa reversa, detección de organismos genéticamente modificados, y análisis de microsatelites (Elnifro et al, 2000, Fernandez et al, 2010, Alvarez et al, 2004)

La PCRm ha abierto un mundo de posibilidades diagnósticas en muchos campos, resulta de gran valor para incrementar la capacidad del número de detecciones por reacción conservando efectividad y disminuyendo costos (Taniuchi et al, 2011). En medicina veterinaria podría llegar a ser de gran interés para laboratorios de diagnóstico, estableciendo múltiples ayudas de manera instantánea tanto como a los animales de compañía, como herramienta diagnóstica para el médico veterinario tratante, debido a la gran exposición de los caninos frente diferentes patógenos transmitidos por garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

El presente estudio tenía como objetivo estandarizar una PCR múltiplex para la detección simultánea de *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis* en sangre de caninos infectados, utilizando dos pares de primers que podrían dar una alta sensibilidad y especificidad para la detección múltiple de estos patógenos. Las secuencias blanco para la PCRm son RNA ribosomal 18S de *H. canis* cuyo región es altamente conservado, útil para diagnóstico (Número de acceso en GenBank AAZ68069.1 , KF322143.1 , MG209594.1, MG209591.1 , MG209585.1, G209581.1, MF588667.1) presentando una copia en su genoma de *H.canis*, y el gen que codifica para la proteína TRAG de *Ehrlichia sp* (Número de acceso en GenBank AAZ68069.1) presentando una copia en su genoma, la cual es de gran importancia para la bacteria ya que pertenece al grupo de proteínas del sistema de secreción tipo IV (Virb D4), que forman un poro multicomponente que permite liberar los factores de virulencia en la membrana del hospedero (Boschioli et al, 2002)

4. Justificación

Debido a los resultados inconclusos de los extendidos de sangre periférica, los límites altos de umbral de detección de las pruebas rápidas, la pérdida de especificidad de las IFI, el diagnóstico indirecto mediante detección de anticuerpos como en los ensayos inmunoquímicos (ELISA) y las discrepancias de estos resultados con la correlación clinicopatológica del paciente, incita a los clínicos tratante a explorar otros diagnósticos diferenciales en patologías que dispersan el diagnóstico al no usar las pruebas PCR, se pretende solucionar un problema que hoy en día son los motivos de consulta más frecuentes en los consultorios, clínicas y hospitales veterinarios realizando un diagnóstico molecular simultáneo de dos patógenos que con frecuencia abundan en los animales de compañía, específicamente caninos. Así mismo, se pretende llevar la prueba hacia un uso comercial en Colombia, debido a que tanto como *Ehrlichia* y como *Hepatozoon canis*, son patógenos del trópico que se están extendiendo hacia el interior del país, convirtiéndose en las enfermedades de mayor preocupación para un propietario de mascota, incluso, para el médico veterinario tratante, ya que se desconoce un tratamiento efectivo para Hepatozoonosis, los clínicos no tienen herramientas para combatirlo, solo se puede disminuir la replicación del parásito, quedándose con el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad a través del tiempo usando PCR con fines de observar disminución de copias circulantes del patógenos después de la instauración del

tratamiento. En el caso de *Ehrlichia*, se está observando resistencia a las tetraciclinas, antibiótico de elección para Ehrlichiosis (Branger et al 2004), debido a que el clínico solo tiene en cuenta como criterio diagnóstico las trombocitopenia leves, moderadas y aplasias medulares, en algunos casos usan IFI o pruebas rápidas, estableciendo tratamientos sin tener diagnósticos definitivos, realizando tratamientos inespecíficos los cuales llevan a fallas terapéuticas y posibles resistencias.

Se pretende implementar la PCRm punto final para la detección de *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis*, simultáneamente se implementara una PCR tiempo real Sonda Taqman para la detección individual de *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis*, con fines validar las dos tecnologías de manera cualitativa tanto punto final como tiempo real. El presente trabajo se proyecta estandarizar para que laboratorios de baja, mediana y alta complejidad usen como prueba diagnóstica la PCR múltiplex. Por ello las validaciones mencionadas se encuentran bajo ISO 17025.

5. Pregunta de investigación y formulación del problema

¿Podrá la PCR múltiplex amplificar dos patógenos simultáneamente, y validarse de manera individual con diferentes protocolos de amplificación?

Formulación del problema: Para los Médicos veterinarios se crea un gran vacío cuando se obtienen resultados positivos en pruebas rápidas debido a que es imposible diferenciar entre un simple contacto con el patógeno y una verdadera infección, estas pruebas solo evidencian resultados cualitativos, sin embargo la IFI, podría cuantificar, pero se resalta, que la prueba depende de la interpretación de un microscopista con experiencia, además de que es necesario repetirla 2 semanas después para observar la seroconversión (aumento de 4 veces los títulos obtenidos inicialmente), retrasando el diagnóstico y posterior tratamiento.

Ahora bien, con respecto a la búsqueda exhaustiva en laminas coloreadas con reactivos (Romanosky), se dificulta la lectura debido a la presencia de artefactos, restos de colorantes, y cantidad de muestra usada para realizar la lectura, no obstante, este proceso hace que la lectura de hematozoarios sea subjetiva y no objetiva. En cuanto al monitoreo de tratamientos es casi imposible realizarlo mediante técnicas de microscopio ya que dependen de parasitemias y estadios febriles.

La PCR múltiplex, requiere de estandarizaciones para obtener fragmentos robustos visibles en geles de agarosa, aunque en la mayoría de los casos los primers compiten por un target, esto hace que existan falsos negativos cuando el paciente presenta bajas copias circulantes del patógeno en cuestión, ahora bien, las enzimas distribuidas por las casas comerciales vienen con la concentración de magnesio justa para servir como cofactor a la taq polimerasa, esto hace se dificulte amplificar dos fragmentos en una sola reacción.

Uno de las barreras de entrada al mercado de la PCR es su costo que conlleva a validaciones de métodos en tiempos prolongados, siendo cada vez más intocable su uso, caso que se quiere resolver, validando una PCR múltiplex punto final a bajo costo y PCR tiempo real sonda taqman

6. Objetivos generales y específicos o hipótesis

6.1 Objetivos generales:

Estandarizar la PCR multiplex punto final y simplex tiempo real para la detección de *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis* en sangre de caninos

6.2 Objetivos específicos:

Determinar el método más apropiado para la extracción de ADN a partir de sangre periférica de caninos, comparando un kit comercial con el método de Salting out.

Diseñar primers específicos *Ehrlichia sp* y *Hepatozoon canis* utilizando herramientas de bioinformática.

Determinar la presencia de *Hepatozoon canis* mediante *PCR tiempo real*

Determinar la presencia de *Hepatozoon canis* mediante PCR punto final.

Determinar la presencia de *Ehrlichia sp* mediante *PCR tiempo real*

Determinar la presencia de *Ehrlichia sp* mediante PCR punto final.

Secuenciar los fragmentos obtenidos por PCR para validar las amplificaciones

Diseñar primers específicos para la detección del control interno de amplificación GADPH

7. Descripción de antecedentes y marco referencial (teórico, conceptual, estado actual, científico y tecnológico) marco conceptual o revisión de literatura.

7.1 Ehrlichiosis

7.1.1 Epidemiología

Es una enfermedad causada por *E. canis* como ehrlichiosis monocítica canina (EMC), debido a su tropismo por las células monocíticas; sin embargo, debido a las dudas surgidas en torno a su etiología, ha recibido múltiples denominaciones, como pancitopenia tropical canina, tifus canino, fiebre hemorrágica canina, síndrome hemorrágico idiopático, Rickettsiosis

canina o enfermedad del perro rastreador. No existe predisposición de edad o sexo en cuanto a la presentación de la Ehrlichiosis, si bien el Pastor Alemán parece una raza más susceptible de padecer la enfermedad, presentándose en una forma más grave y siendo el pronóstico más reservado que en otras razas, lo que podría estar asociado con una diferente respuesta inmunitaria en razas distintas (Nyindo, 1980).

Esta enfermedad fue descrita en el año 1935 en Argelia, a partir de experimentos realizados con perros. El agente descubierto fue llamado en un inicio *Rickettsia canis*, pero posteriormente renombrado en 1945, como *Ehrlichia canis* en honor al bacteriólogo alemán Paul Ehrlich. Hasta la fecha se han encontrado muchas especies de esta bacteria en nuestros animales domésticos. (López et al, 2003) En los años 40 se describen diversas infecciones por este agente en África e India, en los años 50 en las Antillas Holandesas y a partir de los años 60 se describe la enfermedad en Singapur, Vietnam, Estados Unidos y Europa (Ewing, 1969). En la década de los 60, perros militares destacados en Vietnam sufrieron una enfermedad caracterizada por hemorragias, emaciación y una elevada mortalidad. Este proceso se denominó pancitopenia tropical canina y posteriormente su etiología se atribuyó a *E. canis* (Keefe et al, 1982). Desde entonces ha sido reconocida mundialmente como una importante enfermedad infecciosa para perros y otros cánidos. (Skotarczak, 2003). Después de la primera descripción en Argelia en 1935 (Donatein & Lestoquard, 1935), EMC se registró en numerosas áreas en todo el mundo, con frecuencias más altas en las regiones tropicales y subtropicales (Keef et al, 1982; Suksawat et al, 2001; Unver et al, 2001).

E. canis posee una distribución que abarca el trópico y subtrópico de todo el mundo. En América existe evidencia serológica en: Costa Rica, Estados Unidos de América (EEUU), Chile y México (Meneses, 1995; Murphy et al, 1998; López et al, 1999; Rodriguez-Vivas et al, 2005); y evidencia molecular en: Costa Rica, Venezuela, EEUU, Brasil y México (Romero et al., 2011; Pérez et al, 1996; Breitschwerdt et al, 1998; Dagnone et al, 2003; HoriOshima et al, 2006), habiéndose detectado en Venezuela como agente infeccioso de humanos (Pérez et al, 1996; Pérez et al, 2006). El primer reporte de *E. canis* en Costa Rica fue realizado por Meneses (1995), mediante el uso de microscopía e inmunofluorescencia indirecta. Desde entonces este agente ha sido detectado, de forma rutinaria mediante pruebas inmunoenzimáticas, inmunofluorescentes o por presencia de inclusiones (cuerpos de inclusión o mórulas), en laboratorios clínicos y clínicas veterinarias de Costa Rica. Aunque no existen estudios de prevalencia en el país, una investigación realizada en la Universidad Nacional determinó un 70,0% de casos seropositivos en perros sospechosos de sufrir ehrliquiosis (Rímolo, 2006). Recientemente, (Romero et al, 2011) reportaron el primer diagnóstico molecular, aislamiento y caracterización molecular de *E. canis* en Costa Rica.

En sur America, se han reportado el genero Anaplasmaceae en caninos de Brasil (Dagnone et al, 2003, 2009), Venezuela (Unver et al, 2001), Chile (Abarca et al, 2007), and Peru (Vinasco et al, 2007). En Colombia fue reportada por primera vez por técnicas moleculares (Vargas et al 2012), ya que antes solo se había evidencia por detección de anticuerpos de Ehrlichia sp (Parrado y Vargas, 2002; Gomez, 2002; Benavides y Ramirez, 2003; Contreras y Sanabria, 2006; Hidalgo et al, 2009).

7.1.2 Manifestaciones clínicas

Se pueden distinguir 3 fases: aguda, subclínica y crónica, aunque en la clínica esta distinción no es tan frecuente (Woody, 1991). El cuadro clínico del paciente se debe a la respuesta inmunitaria desencadenada por el hospedador: una elevada producción de anticuerpos en combinación con una respuesta celular disminuida que desempeña un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad (Harrus, 1999). La fase aguda se presenta en un período de incubación de 8-20 días tras la picadura de la garrapata y perdura de 2-4 semanas, durante las cuales la bacteria se multiplica y disemina por el organismo (Buhles, 1974). Así mismo se replica en células mononucleares, sobre todo del sistema mononuclear fagocítico, como ganglios, bazo, hígado y médula ósea, provocando en ellos una hiperplasia linfocítica que produce un aumento en su tamaño (Reardon, 1981a). La bacteria se disemina por el organismo, afectando principalmente a pulmones, riñones y meninges. Esta fase se caracteriza por ser leve o benigna (Harrus, 1999) y los signos son, en general, de tipo inespecífico, presentando fiebre, anorexia, pérdida de peso, apatía, depresión, secreción oculo-nasal, mucosas pálidas, linfadenomegalia y hepato-esplenomegalia (Huxsoll, 1972; Buhles, 1974; Troy, 1980; Kuehn, 1985; Woody, 1991; Sainz, 1996b; Neer, 1998). En algunos casos se puede observar también edema en extremidades y escroto (Woody, 1991; Breitschwerdt, 1995a). Adicional pueden presentarse signos hemorrágicos como epistaxis, petequias y equimosis en piel y mucosas, aunque son más frecuentes en la fase crónica. también pueden aparecer signos oculares (Ristic, 1993; Leiva, 2005) como conjuntivitis, opacidad corneal (debido principalmente a edema y precipitados celulares), uveítis anterior, panuveítis, hipema, hemorragias retinianas e incluso desprendimiento de retina (Collins, 1991) o glaucoma secundario (Harrus, 1998a). También se pueden encontrar signos respiratorios, como disnea, exudado oculonasal, cianosis y aumento de intensidad de los sonidos respiratorios, debido a una neumonía intersticial que se puede apreciar radiológicamente (Codner, 1985). En esta fase se pueden encontrar garrapatas en los perros, algunas veces no es un hallazgo constante y sólo se ha constatado en un 40% de los animales afectados (Troy, 1980; Greene, 1985).

En la mayoría de los casos los signos clínicos se resuelven aparentemente sin tratamiento, progresando la enfermedad a la fase subclínica (Codner, 1986; Waner, 1997). En algunos animales se elimina la bacteria por una buena respuesta inmunitaria, sin necesidad de un tratamiento médico (Eddlestone, 2007). Durante la fase subclínica, los pacientes parecen sanos desde un punto de vista clínico (Woody, 1991) y el agente parece estar localizado en células mononucleares del bazo (Harrus, 1998d). La duración de esta fase puede oscilar desde unas semanas (de 40 a 120 días) hasta años (Codner, 1986). Se desconocen los factores que pueden influir en la progresión de la fase subclínica a la fase crónica ni se conoce el porcentaje de perros infectados que pasan a la fase crónica. Un porcentaje considerable de perros, aparentemente sanos, que viven en áreas endémicas de Ehrlichiosis, son seropositivos a *E. canis* y se encuentran en esta fase subclínica de enfermedad, pudiendo permanecer como portadores de este agente (Botros, 1995; Waner, 1997). El bazo secuestra a *E. canis* durante esta fase subclínica de enfermedad, el cual puede influir en la patogenia de la misma (Harrus, 1998d). En infecciones experimentales la anemia, trombocitopenia y leucopenia que aparecen en la fase aguda van disminuyendo hasta alcanzarse recuentos normales (Buhles, 1974). En infecciones naturales, estas alteraciones hematológicas suelen persistir (Codner, 1986). Así, se puede definir la fase subclínica como aquella en la que existe ausencia de signos clínicos con presencia de alteraciones hematológicas (Codner, 1986). Más

concretamente, Breitschwerdt y colaboradores señalan que esta fase subclínica está caracterizada por presentar trombocitopenia, leucopenia variable y anemia sin la presentación de signos clínicos (Breitschwerdt, 1995a). En esta fase la respuesta inmunitaria predominante es de tipo humoral (Greene, 1984).

Las fases aguda y crónica de la Ehrlichiosis están muy bien documentadas e investigadas, posiblemente por el hecho de que los animales en estas fases están clínicamente enfermos, lo que no ocurre en la fase subclínica, cuyo conocimiento es más limitado. La Ehrlichiosis canina frecuentemente se diagnostica durante la fase crónica. Los animales suelen llegar a esta fase debido a un sistema inmunitario ineficaz, que no es capaz de eliminar el agente causante de la enfermedad (Perille, 1991; Bartsch, 1996; Harrus, 1999). Los perros que llegan a esta fase se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad y su pronóstico es reservado (Harrus, 1997b). La severidad depende de distintos factores como la virulencia de la cepa de *E. canis*, la edad del animal, raza, estado inmunitario, la existencia de enfermedades concurrentes y el estrés (Nyindo, 1980; Greene, 1984). El Pastor Alemán parece estar más predispuesto a padecer una forma más grave y crónica de la enfermedad y con peor pronóstico que el Beagle (Huxsoll, 1970; Nyindo, 1980). En la fase crónica nos encontramos de nuevo con signos inespecíficos similares a los de la fase aguda, como letargia, anorexia, pérdida de peso, fiebre, mucosas pálidas, esplenomegalia y linfadenopatías, entre otros (Troy, 1980; Harrus 1997c, 1999; Frank, 1999). También pueden presentarse signos hemorrágicos, como melena, epistaxis, petequias o equimosis, hipema, hemorragias retinianas, hematomas subcutáneos y sublinguales, hematoquezia o hematuria, en un 25-60% de los casos (Troy, 1980; Frank, 1999; Mylonakis, 2004). De todos estos signos hemorrágicos, el más frecuente es la epistaxis, uni o bilateral (Huxsoll, 1970; Woody, 1991; Sainz, 1996b; Harrus, 1997c; Mylonakis, 2004). Así mismo se pueden encontrar en esta fase signos oculares, como conjuntivitis, uveítis anterior, hipema, neuritis óptica, glaucoma secundario, edema corneal, panuveítis, cambios retinales e incluso ceguera (Harrus, 1998a; Frank, 1999; Mylonakis, 2004; Leiva, 2005). Según algunos autores, el desprendimiento de retina es el signo ocular más común (Leiva, 2005); para otros, es más frecuente la uveítis anterior (Gelatt, 1991). También pueden aparecer signos neurológicos como ataxia, paraparesis, ataques, síndromes convulsivos, déficit de la propiocepción o nistagmo (Meinkoth, 1989; Woody, 1991; Frank, 1999). Estos signos neurológicos podrían atribuirse a hemorragias, vasculitis o infiltración plasmocitaria perivascular en meninges (Hibler 1986; Woody, 1991; Maretzki, 1994). Algunos casos pueden presentar alteraciones locomotoras por polimiositis, mono o poliartritis (Bellah, 1986; Cowell, 1988), pero la mayoría de las veces éstas son causadas por especies granulocíticas como *E. ewingii* o *A. phagocytophilum* (Cowell, 1988; Anderson, 1992). Se pueden encontrar problemas cutáneos asociados a la Ehrlichiosis, mala calidad del pelo e incluso dermatitis alopécicas con eritema y descamación (Sainz, 1996b). También se puede presentar insuficiencia renal, habitualmente debida a glomerulonefritis, y síndrome nefrótico (Troy, 1980; Codner, 1992). El aparato reproductor femenino también se puede alterar, presentándose abortos, esterilidad y muerte neonatal, entre otros (Woody, 1991). Como síntomas respiratorios, pueden aparecer exudados nasales, disnea y tos, como resultado de una neumonía intersticial, observándose a nivel radiológico un patrón pulmonar intersticial (Codner, 1985; Kuehn, 1985; Sainz, 1996b; Frank, 1999). La presencia de hemorragias en el miocardio puede producir síntomas como taquicardia o arritmias, que pueden acompañarse de disnea (Hibler, 1986; Woody, 1991).

En general, los signos clínicos podrían variar según el área geográfica, siendo en ocasiones atípicos, e igualmente se debe tener en cuenta la posibilidad de presentación de coinfecciones con otros agentes distintos, que pueden producir una sintomatología muy variada, complicando el diagnóstico (Trapp, 2006). Por tanto, se hace indispensable el uso de técnicas moleculares para descartar las distintas fases de la enfermedad. Aunque cada fase posee una sintomatología característica, muchas de las manifestaciones clínicas pueden aparecer tanto en la fase aguda como en la crónica. Además, debido a la inconstancia y a la distinta intensidad de los síntomas, es difícil diferenciar clínicamente estas fases.

7.1.3 Transmisión

La bacteria llega a sangre tras la picadura de la garrapata y desde allí infecta leucocitos circulantes y células del sistema mononuclear fagocitario (Walker et al 1997). *Ehrlichia* inicialmente se desarrolla en forma de cuerpos elementales aislados con un diámetro de 0,5 a 0,9 μm (Nyindo et al 1971). Los organismos penetran al interior de las células por endocitosis, mediada por receptores proteicos de la superficie celular (Messick et al 1993), allí se inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, retrasando la apoptosis celular y facilitando la multiplicación de las bacterias. Los cuerpos elementales aumentan de tamaño, se replican por fisión binaria y se agrupan, denominándose cuerpos iniciales, de 1,4 a 2 μm de diámetro (Nyindo, 1971). Continúa el crecimiento y replicación de estos dando lugar a las mórulas, llamadas así por su forma típica (Nyindo et al, 1971). Las mórulas están rodeadas por una membrana que engloba un número variable de cuerpos elementales (Weiss et al 1981), y que tiene un tamaño mayor a 2 μm . Los organismos se liberan de la célula hospedadora por lisis celular y exocitosis (Rikihisa et al, 1991). El ciclo de infección se completa en 12-18 días (Weiss et al 1981). En adición, también se puede transmitir la enfermedad por medio de transfusiones sanguíneas a partir de donantes infectados con Ehrlichiosis, puesto que se ha visto que es posible la infección experimental a través de transfusión sanguínea de unas especies animales a otras (Ristic et al 1972; Groves, 1975; Neer, 1998; Arguin, 1999; Cohn, 2003; Reine, 2004). La transmisión directa de perros a humanos no se ha identificado (Parzy, 1991).

7.1.4 Diagnóstico

Las alteraciones en los paraclínicos generales son variables, pero en términos generales se puede afirmar que el dato hematológico más consistente en la fase aguda, y que permanece durante las demás fases, es la trombocitopenia (Huxsoll, 1970; Troy, 1980; Woody, 1991; Ristic, 1993; Harrus, 1997c; Waddle, 1988; Frank, 1999), aunque también existen casos con valores plaquetarios normales (Woody, 1991; Frank, 1999). Se han estudiado los mecanismos que pueden desencadenar esta trombocitopenia, como la inflamación del endotelio vascular y el consiguiente consumo de plaquetas (Abeygunawardena, 1990), el secuestro de plaquetas en el bazo (Pierce, 1977; Kakoma, 1978) y la destrucción inmunomediada o no inmunomediada de plaquetas (Weisiger, 1974; Smith, 1975) por anticuerpos antiplaquetas (Waner, 1995; Harrus, 1996b). Además de la trombocitopenia,

puede haber trombocitopatías por alteraciones en la agregación plaquetaria, habiéndose identificado en perros con Ehrlichiosis un factor de inhibición de la migración plaquetaria (PMIF), producido por los linfocitos B que induce cambios en la superficie de las plaquetas haciéndolas más susceptibles a su destrucción por células del sistema mononuclear fagocitario. (Kakoma, 1978, 1980). En esta fase la trombopoyesis funciona correctamente, por lo que hay un aumento del porcentaje de megatrombocitos (Pierce, 1977). También es posible observar anemia (Kuehn, 1985; Harrus, 1997c; Frank, 1999) que puede variar de leve a intensa y que suele ser al inicio regenerativa, destrucción de hematíes por mecanismos inmunitarios (Reardon, 1981a), y en fases más avanzadas puede ser no regenerativa, por destrucción continua de glóbulos rojos, pérdida de sangre y aplasia medular (Woody, 1991).

La eritrofagocitosis es un hallazgo común y algunos pacientes presentan un resultado positivo en el test de Coombs (Woody, 1991). Estos resultados sugieren la posibilidad de una unión inespecífica de anticuerpos a la superficie de los eritrocitos, lo que podría ayudar a la instauración de un cuadro hemolítico agudo en algunos casos (Breitschwerdt, 1995a). Adicional, el canino puede presentar inicialmente una leucopenia (Buhles, 1974; Reardon, 1981a) debida al secuestro de leucocitos por procesos inmunitarios e inflamatorios (Ristic, 1976), y posiblemente a la alteración en su funcionalidad por un factor citotóxico similar al PMIF y por otro factor inhibidor de la migración leucocitaria (Kakoma, 1977; Nyindo, 1980). Posteriormente, la leucopenia puede transformarse en leucocitosis (Hibler, 1986). En cuanto a la bioquímica sanguínea, es frecuente observar en la fase aguda una hiperproteinemia originada por una hiperglobulinemia (Troy, 1980; Kuehn, 1985; Codner, 1986; Waddle, 1988; Sainz, 1998), a su vez provocada por una hipergammaglobulinemia (Burghen, 1971) que por lo general es policlonal, con un aumento de las fracciones alfa-2, beta y gammaglobulinas, debido al incremento de la respuesta humoral en esta enfermedad (Harrus, 1997c). No obstante, la hiperglobulinemia también puede ser monoclonal, por aumento de las inmunoglobulinas G (Breitschwerdt, 1987; Harrus, 1996a). También se puede presentar una hipoalbuminemia por pérdida de proteínas en orina o por otras causas, como la presencia de edemas, pérdida de peso o procesos inflamatorios (Hibler, 1986; Davoust, 1991). Las pruebas de funcionalidad hepática pueden estar normal, aunque se han descrito aumentos ligeros en los valores de las enzimas hepáticas en el suero (Troy, 1980; Harrus, 1997c), que se pueden acompañar de hiperbilirrubinemia (Troy, 1990). El aumento en el valor de la creatinina podría tener un origen prerrenal (deshidratación) o renal, pudiéndose observar uremia asociada a glomerulonefritis y a plasmocitosis intersticial renal (Troy, 1980; Breitschwerdt, 1987).

En caninos con problemas hemorrágicos, se pueden producir tiempos de hemorragia prolongados, aunque el tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina (TTP) y los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (FDP's) pueden ser normales (Kuehn, 1985). La prolongación en los tiempos de hemorragia puede ser debida a una trombocitopenia o a una trombocitopatía, pero la severidad de la hemorragia no suele estar correlacionada con el nivel de trombocitopenia (Woody, 1991). En la fase subclínica, se puede observar trombocitopenia, con un aumento en el tamaño de las plaquetas, lo que sugiere una activa trombopoyesis y una buena actividad de la médula ósea. También se puede detectar hiperglobulinemia, leucopenia y anemia (Breitschwerdt, 1995a; Waner, 1997). Las alteraciones laboratoriales que se pueden encontrar en la fase crónica incluyen anemia (Mylonakis, 2004) y pancitopenia por hipoplasia o aplasia medular que pueden acabar con la muerte del canino (Buhles, 1974; Kuehn, 1985; Mylonakis, 2004). A menudo se detectan

otras alteraciones clásicas en la bioquímica sérica como hiperproteïnemia, producida por una hiperglobulinemia que a su vez es provocada por una hipergammaglobulinemia habitualmente policlonal (Kuehn, 1985), aunque no es infrecuente observar bandas monoclonales (Codner, 1986; Breitschwerdt, 1987). En algunos casos con afección hepática y/o proteinuria, se puede presentar una hipoalbuminemia (Harrus, 1996a; Mylonakis, 2004), que hace que los valores de proteínas séricas totales puedan ser normales, por lo que estaría recomendado realizar un proteinograma. También se pueden observar aumentos en los valores de enzimas hepáticas (Mylonakis, 2004). Los hallazgos más frecuentes en el urianálisis son hematuria y proteinuria (Frank, 1999; Mylonakis, 2004), habitualmente producidas por una glomerulonefritis inmunomediada similar a la encontrada en perros con leishmaniosis (Troy, 1980; Codner, 1992; Varela, 1997).

Teniendo en cuenta la exposición al vector, junto con los signos clínicos y las alteraciones en los paracloïnicos, nos puede orientar en el diagnóstico. No obstante, estos hallazgos no suelen ser concluyentes, dada la naturaleza inespecífica de los mismos. Por tanto, el diagnóstico definitivo debe basarse en pruebas de diagnóstico que determinen directa o indirectamente la presencia del agente patógeno en el animal. El diagnóstico definitivo se puede basar en la observación de las inclusiones citoplásmicas características de estos agentes (Elias, 1991; Mylonakis, 2003), denominadas, como hemos mencionado con anterioridad, cuerpos elementales (0,5-0,9 μm de diámetro), cuerpos iniciales (1,4-2 μm de diámetro), o mórulas (>2 μm de diámetro), a partir de frotis sanguíneos o de aspirados de bazo, médula ósea, pulmón, hígado o linfonódulos, o bien en líquido cefalorraquídeo, sinovial o incluso prostático (Bellah, 1986; Elías, 1991; Meinkoth, 1998; Neer, 2006). Los frotis sanguíneos se tiñen con los colorantes de hematología como el Giemsa o Romanowsky. Según algunos autores, si se lleva a cabo un cultivo primario de leucocitos sanguíneos, el número de mórulas detectadas es mayor que en muestras de sangre, linfonódulos o médula ósea (Mylonakis, 2003). En el caso de la sangre, el uso de técnicas de leucoconcentración por centrifugación o sedimentación también aumenta la probabilidad de identificar las mórulas, al seleccionarse principalmente las células blancas (Huxsoll, 1970). Algunos estudios han observado en perros un 3-34% de infección en los leucocitos (Egenvall, 1998). A pesar de que la observación del agente causal es una técnica específica, es poco sensible, ya que las mórulas aparecen con mayor frecuencia en la fase aguda y de forma transitoria, por una mayor presencia de leucocitos infectados en esta primera fase, por lo que su detección es compleja (Troy, 1980; Greene, 1984; Kuehn, 1985; Hibler, 1986). Por tanto, un resultado negativo no descartaría la infección. Además, es necesario personal entrenado y cualificado para la detección de las mórulas, dado que es fácil confundirlas con artefactos, tinciones mal realizadas u otras inclusiones (Mylonakis, 2003). En el caso de *A. platys*, las mórulas aparecerían en las plaquetas, pero dada la naturaleza cíclica de aparición del agente en las plaquetas en la Ehrlichiosis producida por *A. platys*, no compensa realizar esta técnica (Harrus, 1997a). En general, en perros con Ehrlichiosis sólo un 4% de los frotis evaluados suelen ser positivos (Woody, 1991). También es posible el cultivo del agente en líneas celulares específicas para cada especie (Nyindo, 1971), y a pesar de ser una técnica específica, tiene los inconvenientes del precio y el elevado tiempo que requiere el agente para su crecimiento (14-34 días incluso) (Iqbal, 1994), por lo que se usa en investigación. El cultivo de los agentes in vitro es un requisito previo para el uso de técnicas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), dado que se utilizan los agentes que crecen en cultivo como antígeno de la reacción serológica. *E. canis* se ha cultivado satisfactoriamente en

monocitos sanguíneos caninos, macrófagos peritoneales caninos, hibridomas y macrófagos peritoneales de ratón; también crece satisfactoriamente en líneas celulares específicas, como en la línea MDH-SP y la DH82 (Rikihisa, 1991). *N. risticii* y *A. phagocytophilum* crecen en cultivos primarios a base de monocitos caninos y de sangre procedente de ovino, así como en líneas celulares específicas como las 32 HL-60 en el caso de *A. phagocytophilum* y la P388D1 de ratón, T-84 y U-937 en el caso de *N. risticii* (Rikihisa, 1991).

Las técnicas moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, han demostrado ser métodos sensibles y específicos para detectar estas infecciones. Esta técnica permite detectar cantidades muy pequeñas de una secuencia de ADN o ARN específica de un microorganismo y amplificarla logarítmicamente, de manera que sea posible detectarla por métodos visibles, como la electroforesis, que nos mide el tamaño del fragmento amplificado y el patrón de migración. Para que se produzca la reacción, se utilizan cebadores específicos que se unen a la porción de ADN a amplificar. Los primers usados pueden ser de tipo random o inespecíficos de especie, que permiten detectar la mayoría de organismos que pertenecen al género en cuestión, o específicos de especie, que ayudan a identificar especies concretas (Breitschwerdt, 1998a). Muchos laboratorios utilizan en primer lugar los primers inespecíficos y, si se obtiene un resultado positivo, ya se usan cebadores más específicos de especie, para identificar el agente en concreto. Normalmente se utiliza sangre completa en EDTA para la realización de la técnica. En el caso de *E. canis*, la PCR permite detectar el organismo a los 4-10 días post-infección (Iqbal, 1994; Wen, 1997), en ocasiones, antes de que se produzca la seroconversión. La PCR teóricamente detecta infección activa por el organismo, ya que detecta ADN del mismo. Esta técnica ayuda a confirmar la eliminación terapéutica del organismo; así, la técnica permite distinguir entre animales tratados, pero con infección persistente de aquellos en los que el tratamiento ha tenido éxito pero que poseen títulos elevados de anticuerpos y por tanto son positivos en la serología (Wen, 1997; Harrus, 1998b). Sin embargo, la técnica posee algunos inconvenientes, como su precio, la falta de estandarización entre laboratorios o la aparición de falsos negativos o falsos positivos (McBride, 1996). Los falsos negativos se podrían deber a una incorrecta extracción de ADN, presencia de inhibidores de la PCR, como la heparina, problemas relacionados con la técnica o con la muestra de la que se obtiene el ADN, o a que en fases crónicas la sensibilidad puede ser menor debido a que la presencia del organismo en sangre es menor, o incluso podría estar secuestrado en otros tejidos. Los falsos positivos se podrían producir por una contaminación con ADN no procedente de la muestra o amplificaciones inespecíficas (Neer, 2006). Por tanto, el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) recomienda usar la PCR en combinación con la serología para el diagnóstico de estas enfermedades (Neer, 2002). La PCR empleada varía en función de los laboratorios y del agente objeto de estudio; así, para el diagnóstico de estas enfermedades se pueden usar técnicas de PCR de un solo paso o simples (Iqbal, 1994), en las que en una sola reacción obtenemos la amplificación deseada.

El problema de este tipo de PCR es la unión de los cebadores a regiones incorrectas del ADN, dando productos inesperados; por ello, se desarrolló otro tipo de PCR, que es una variación de la PCR simple, llamada PCR anidada o “nested” (Wen, 1997), en la que se emplean dos pares de primers en dos reacciones de PCR sucesivas, siendo la segunda reacción destinada a amplificar el producto obtenido en la primera reacción de PCR, reduciendo así la contaminación posible por uniones inespecíficas de los cebadores. Esta PCR es considerada

por muchos autores como más específica que la PCR simple (Wen, 1997). Más recientemente desarrollaron la PCR en tiempo real (Bell, 2005), en la que se usan marcadores o sondas fluorescentes que permiten la monitorización continua de la formación del amplicón o producto de la PCR a lo largo de la reacción (Williams, 1998), permitiendo así la cuantificación de los productos obtenidos en cada muestra y en cada ciclo. También se utiliza otro tipo de técnicas moleculares para la detección de estos agentes, como la PCR con hibridación en fase sólida (RLB), la cual permite detectar estos organismos con una elevada sensibilidad y especificidad (Sparagano, 2003). Esta técnica está basada en sondas de DNA específicas de especie y género y permite identificar infecciones mixtas y diagnosticar distintos patógenos al mismo tiempo (Sparagano, 2003).

En relación con las técnicas moleculares, diversos estudios han demostrado la técnica de PCR como un método efectivo y sensible para la detección de *E. canis* (Ndip et al., 2005). La técnica de PCR convencional, basada en la amplificación de regiones del gen 16S ARNr de *Ehrlichia*, ha demostrado efectividad en muestras de sangre de humanos y perros con un límite de detección de 20pg para ADN de *E. canis* extraído de células DH82 infectadas (Iqbal et al., 1994; Dawson et al., 1996), y se han obtenido aún mejores resultados utilizando una técnica de PCR tipo anidado, que incrementa la sensibilidad analítica de la prueba hasta 0,2 pg de ADN (Wen et al, 1997). Además, la técnica de PCR tipo anidado ofrece la ventaja de poder determinar las especies *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* utilizando el mismo producto de la primera reacción. Esta técnica de PCR anidado ha demostrado ser útil para el diagnóstico de ehrliquiosis en distintas partes del mundo (Harrus et al., 1998a; Murphy et al., 1998; Aguirre et al, 2004; Hori-Oshima et al, 2006), ya sea para diagnosticar los agentes en muestras de humanos, animales domésticos y silvestres, como en garrapatas (Lockhart et al, 1997; Murphy et al, 1998; Kocan et al, 2000). Otra ventaja es la capacidad de la prueba para detectar los agentes aún en la fase temprana de la enfermedad y en la fase subclínica, permitiendo identificar animales portadores, incluso cuando no se ha logrado establecer aún una respuesta inmune (Harrus et al, 1998a; Standaert et al, 2000), lo que permite iniciar el tratamiento, inclusive antes de la manifestación de signos clínicos

En cuanto al diagnóstico indirecto se cuenta con la serología que es una de las técnicas más comúnmente empleadas para el diagnóstico de estas enfermedades. Consiste en detectar la presencia del agente mediante la valoración de la respuesta inmunitaria humoral del hospedador, midiendo la producción de anticuerpos. Se puede observar un título elevado de anticuerpos tras la exposición al agente, en cualquier fase de la enfermedad, e incluso tras el tratamiento (Cohn, 2003). Un título positivo en una zona endémica no confirma que la infección sea causada por la *Ehrlichia*, confirma sólo exposición al agente. No obstante, un título positivo, unido a la presentación de signos clínicos o alteraciones en paraclínicos, serían diagnóstico (Neer, 2002). Un título negativo tampoco descarta la infección, como veremos más adelante. Exista infección activa o no, por tanto, la interpretación de los resultados debería realizarse siempre conjuntamente con el caso clínico y no de forma aislada. La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica descrita por Ristic y colaboradores en 1972, de alta sensibilidad y especificidad, fácil manejo y bajo coste, y se le considera la técnica serológica “gold-standard” (Ristic, 1972; Waner, 2001; Neer, 2002). A pesar de que se han desarrollado otros métodos de diagnóstico de estas infecciones, continúa usándose esta técnica con mucha frecuencia (La Scola, 1999). En ella se emplean generalmente cultivos celulares infectados como antígeno (Ristic, 1972; Dawson, 1991). En

ocasiones nos permite detectar anticuerpos frente al agente en cuestión a los 7 días post-infección, aunque muchos pacientes seroconvierten más tarde, a veces incluso 28 días post-infección (Ristic, 1972; Buhles, 1974). Aquellos animales que se encuentran muy graves pueden ser incapaces de desarrollar anticuerpos frente al agente (Weisiger, 1975; Waner, 2001). Por tanto, cuando sea posible, se recomienda repetir la prueba 2-3 semanas después para buscar una seroconversión en casos sospechosos que presentan un resultado serológico negativo. En los primeros 4-7 días los anticuerpos suelen ser inmunoglobulinas tipo A y M, y a los 15 días aproximadamente predominan las inmunoglobulinas tipo G (Weisiger, 1975; Waner, 2001). La aparición de los anticuerpos Ig G parece depender de la cantidad de organismos infectantes (Rikihisa, 1992). Así, estudios experimentales muestran que es posible detectar los anticuerpos IgG a los 3 días post-infección cuando la carga infectante es muy elevada (Iqbal, 1994). La mayoría de los laboratorios suelen evaluar este último tipo de anticuerpos. En general, los títulos bajos se deben confirmar unas semanas después, con la demostración de una seroconversión en 2 análisis sucesivos. Algunas limitaciones de la técnica de IFI son, por ejemplo, que sólo se puede realizar en laboratorios especializados, que la lectura de los resultados es subjetiva, y que no diferencia entre infecciones por diferentes agentes próximos (Breitschwerdt, 1998). Tampoco existe estandarización entre laboratorios y, de hecho, se pueden observar resultados discordantes de una misma muestra de suero en distintos laboratorios (Kakoma, 2000). Algunos autores afirman que, al realizar la técnica de IFI usando antígenos autóctonos, el título obtenido es ligeramente mayor que cuando se emplean antígenos foráneos (Keysary, 1996; Aguirre, 2008). Son posibles las reacciones cruzadas entre distintas especies de la familia *Ehrlichia*, lo que puede suponer un problema en la interpretación de los resultados de la serología (Neer, 1998; Breitschwerdt, 1998a), aunque los títulos suelen ser mayores para el agente que realmente está causando la infección (Woody, 1991). Así, la obtención de títulos bajos no suele ser diagnóstica y puede significar exposición a otros organismos diferentes al buscado. Las reacciones cruzadas son causadas por proteínas externas de membrana inmunodominantes que tienen un tamaño similar. *E. canis* podría tener reacción cruzada con *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii*, *N. helminthoeca* y con *A. phagocytophilum* (Rikihisa, 1991b; Shankarappa, 1992; Waner, 2001, 2001b; Neer, 2006). Por tanto, un problema asociado a estas técnicas es la obtención de resultados falsos positivos, es decir, obtener un resultado positivo cuando realmente es otro agente distinto al que se está buscando causante de la infección (Neer, 2006).

Desde un punto de vista clínico, todos estos agentes son parecidos y su abordaje clínico y terapéutico es similar. Aunque se recomienda usar la serología y la PCR conjuntamente para el diagnóstico de estas enfermedades, algunos estudios muestran una baja correlación entre los resultados de ambas técnicas (Seaman, 2003). Así, por ejemplo, en un estudio se ha demostrado, empleando la IFI y la PCR conjuntamente, que sólo el 50% de animales seropositivos eran positivos por PCR a *E. canis* (Wen, 1997). Existen, además, casos de ehrlichiosis refractaria en los que no ha sido posible detectar al agente mediante PCR, ni en cultivo, ni ha sido satisfactoria la transmisión de la enfermedad inoculando a otro animal sano, lo que sugiere que la persistencia de anticuerpos frente a un agente junto con signos clínicos y paraclínicos después de un tratamiento anti-rickettsial no está siempre asociado a la identificación del organismo mediante técnicas moleculares (Breitschwerdt, 2001). Debido a la masiva producción de antígenos de estos agentes en cultivos en líneas celulares, se han desarrollado otras técnicas inmunológicas para el diagnóstico de estas infecciones, como el enzyme-linked immunosorbent assay o ELISA y el inmunoblot (Nyindo, 1991; Rikihisa,

1992; Hegarty, 1997; Waner, 2000; Harrus, 2002). La técnica de ELISA aplicada al diagnóstico de *E. canis*, sirve para la detección de anticuerpos de tipo IgG frente a este agente en la muestra. Existen tests comerciales que emplean antígeno completo o proteínas inmunodominantes y que ponen esta técnica al alcance de los clínicos (Waner, 2000; Harrus, 2002), sin necesidad de equipo especial ni personal cualificado. Algunos autores consideran estas técnicas como específicas y bastante sensibles (Harrus, 2002; Davoust, 2006). No obstante, existen numerosos estudios comparando las técnicas de IFI, western blot y ELISA comercial, mostrando una baja correlación, especialmente a títulos bajos (O'Connor, 2006), por lo que algunos autores la consideran poco fiable (Waner, 1996). El inmunoblot respalda a las técnicas de IFI y ELISA en cuanto a que sirve para caracterizar y distinguir las diferentes especies responsables de la infección (Rikihisa, 1994), hecho que puede ser relevante, especialmente debido a la existencia de reacciones cruzadas. El western blot para *E. canis* pone de manifiesto un gran número de proteínas reactivas, siendo las más predominantes las de 22 a 30 kDa (Matthewman, 1993; Hegarty, 1997). Concretamente, entre los distintos antígenos proteicos de membrana de *E. canis*, las proteínas en el rango de 30 kDa constituyen los antígenos dominantes (Rikihisa, 1994; Ohashi, 1998). Usando esta técnica de Western blot se pueden detectar anticuerpos frente a *E. canis* a los 2-8 días post infección.

Debido a la naturaleza inespecífica de los signos clínicos de la Ehrlichiosis canina, es posible confundirla con otras patologías que cursan con una sintomatología similar (Woody, 1991); entre ellas están el lupus eritematoso sistémico, el mieloma múltiple, el linfoma o la leucemia linfocítica crónica (Weiser, 1991; Heeb, 2003). Por tanto, el hallazgo de una trombocitopenia es frecuente en el curso de las Ehrlichiosis, se debe también diferenciar estas infecciones de una trombocitopenia inmunomediada; sin embargo, en esta última no solemos detectar los síntomas generales de la Ehrlichiosis, a pesar de que sí encontramos los cuadros hemorrágicos (Troy, 1990). Otros agentes como *Babesia* spp, *Hepatozoon* spp, y *Bartonella* spp, que comparten vector con los agentes Ehrlichiales y, a veces, también sintomatología, deben ser descartados (Bool, 1957; Elias, 1988; Klag, 1991; Ramírez, 2001; Trapp, 2006). En nuestro entorno geográfico, es frecuente confundir la Ehrlichiosis con la leishmaniosis (Tesouro, 1993; Sainz, 1996b; Guillén, 2002), ya que comparten muchos síntomas clínicos, distinguibles mediante técnicas serológicas y moleculares. En cualquier caso, debemos tener en cuenta la elevada frecuencia de presentación conjunta de ambas enfermedades en un animal. Para llegar al diagnóstico, es importante valorar la presencia de enfermedades concurrentes con la Ehrlichiosis. De nuevo, la mayoría de las coinfecciones en el perro se deben a *Leishmania* spp. y *Ehrlichia* spp. En casos en los que se trata una de las enfermedades y se produce un descenso en el título de anticuerpos para ese agente, pero persisten los signos clínicos, hay que pensar en la posibilidad de que sea el otro agente el que produce parcialmente el cuadro clínico. También se encuentran casos en los que aparece una infección concurrente entre *Ehrlichia* spp. y *Babesia* spp. (Klag, 1991), especialmente en el norte de España, con *Hepatozoon* spp. (Bool, 1957; Elias, 1988) o con moquillo (Sainz, 1996b). En ocasiones en las que existe infección concurrente de varios agentes, a veces no es posible diferenciar cuál de los agentes es el principal causante de los signos clínicos (Frank, 1999).

7.2 *Hepatozoon canis*

7.2.1 Epidemiología

La Hepatozoonosis es una infección ampliamente distribuida por el mundo debido a la presencia del vector que es el *Rhipicephalus sanguineus* que es el más prevalente en el mundo (Wenyon 1931): *H. canis* se encuentra en Africa, Sur de Europa, Sur America, Medio oriente (Gevrey 1993; Craig, 1990; Baneth, 2006; Craig, 1984). Esta enfermedad se manifiesta como una enfermedad enzootica con prevalencia variable; Portugal 36%, Colombia 31,8% (Hernandez, 2001), Nigeria 17,6%, India 2,5%, Israel 2,3%, Thailandia 2,1% (Gevrey 1993), áreas rurales de Rio de Janeiro, Brasil 39% (O'Dwyer et al, 2001), Malasya 1,2% (Rajamanickam, 1985).

Otras infecciones son transmitidas por la misma garrapata tales como, Ehrlichiosis, Babesiosis y enfermedad de Lyme las cuales hace que existan coinfecciones con *H. canis*, los perros infectados probablemente desarrollen fases subclínicas desarrollando anticuerpos de protección o enfermedad. Mostrandose como seropositivos, en Israel es del 33%, pero solo el 3% presentan gamontes en extendido de sangre periférica, y solo el 1% muestran síntomas (Baneth et al 1996)

El análisis filogenético de la región 18S del RNA ribosomal de *H. canis* secuenciados en Israel y Japon han mostrado 99% de identidad con *H. canis* y difieren de *H. americaninum* (Inokuma et al 2002).

La principal ruta de infección en perros es la ingestión de garraparas que contienen oocistos maduros, también se ha reportado la transmisión vertical, en conjunto con *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* (Murata et al, 1993). En infecciones experimentales no se ha tenido éxito con inoculación parental de tejidos o sangre de perros infectados, pero si lograron la inoculación de tejido con garrapatas infectadas (Wnyon, 1931). Algunas especies de garrapatas infectan serpientes, lagartijas y ranas, podría se transmitida por ingestión de cistos en tejidos de un hospedero intermediario (Smith, 1996)

No existe predisposición de edad para adquirir la infección, se pueden infectar tanto como neonatos has adultos (Smith, 1996; Baneth, 1996; Baneth, 1997). En la mayoría de los casos de infecciones por *H. canis* son detectadas en estaciones cálidas, cuando la actividad del vector es más alta, sin embargo, los síntomas también son observados durante los meses frios, debido a que la infección es persistente (Baneth, 1997). El rango de hospederos de *H. canis* en carnívoros no es claro, excepto en perros domestico, muchas especies de Hepatozoon son morfológicamente similares observados en otros carnivorors como; zorros, chacal de espalda negra, chacal dorado, perro silvestre africano, hiena, leopardo y pantera. El potencial de *H. canis* para infectar a otras especies es considerable y hay especies genéticamente relacionadas con caninos domésticos, esto podría ser confirmado por transmisión experimental de tipificación genética y comparación con cepas aisladas. (Ivanon et al 2008).

7.2.2 Manifestaciones clínicas

Muchas de las infecciones por *Hepatozoon canis* no siempre causan sintomatología, pero cuando inicia, puede causar un síndrome clínico preciso caracterizado por miositis crónica,

debilidad y muerte, que pocas veces se asocian, aunque se presenten algunos casos. Los síntomas más frecuentes son; descarga oculonasal, mialgias con trastornos de locomoción, pérdida ponderal e hiperestesia sobre las regiones paraespinales y linfadenomegalia severa a las 3 semanas; síntomas entéricos sanguinolentos durante días o semanas, anorexia, pérdida de peso, emaciación, la caquexia se presentan en muchos casos; la formación de pápulas dérmicas, el proceso febril persiste hasta por 24 semanas, afección ganglionar, proliferación del perióstio (columna vertebral, costillas, extremidades), letargia, rigidez cervical, parálisis lumbar, adenopatías, el paciente muere por miositis crónica y debilidad (Macintire et al, 1997).

En varios estudios en caninos infectados experimentalmente con *H. canis*, el signo clínico más frecuente era anemia, emaciación, y fiebre intermitente, en algunas ocasiones caquexia, depresión, hiperestesia muscular, conjuntivitis purulenta y rinitis. Los signos menos frecuentes son diarrea, anorexia, paraparesia y paraparálisis. La baja parasitemia con gamontes en menos del 5% de los neutrófilos es relacionada con pacientes asintomáticos, los signos clínicos más severos son característicos de altas parasitemias con leucocitosis mayor o igual 150.000/ul (Baneth et al, 2006).

En el musculo esquelético, se observan cistos de 250uM que son los llamados clusters o agrupamientos de pequeñas estructuras llamadas microesquizontes, en musculo se forman cluster de neutrófilos causando dolor, fiebre y proliferación en periostio, estas proliferaciones son localizadas en los sitios de ataque de músculos de vertebras, pelvis, radio, cubito, humero, femur, y tibia. Las lesiones en hueso no se presentan en todos los animales, pero son más comunes en perros jóvenes menores de 1 año (Craig, 1990)

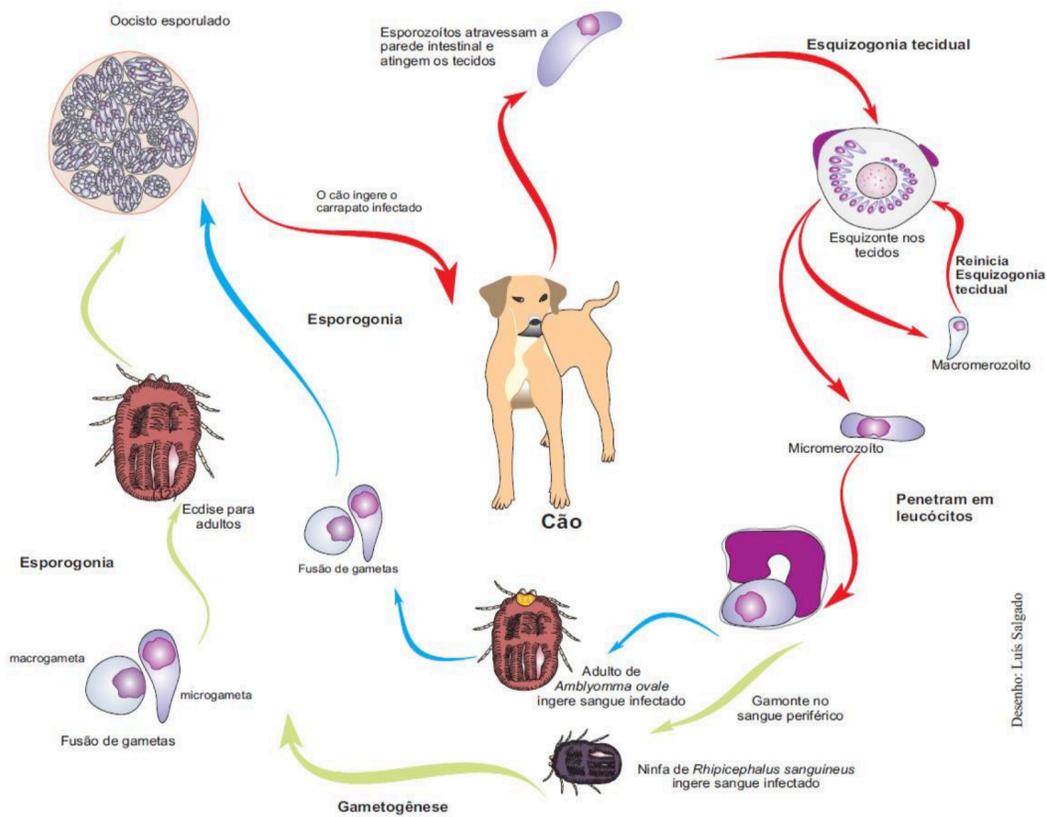
7.2.3 Transmisión

La Hepatozoonosis canina es de transmisión transtadial, que depende de la garrapata *Rhipicephalus sanguineu* que se infecta inicialmente por la ingestión de sangre que contiene monocitos y neutrófilos contaminados por isogamontes del huésped vertebrado infectado o sea otro canino u otro hospedero (roedor), e infectará a otros huéspedes cuando estos la ingieran y trituren la garrapata en donde se liberan esporozoítos. El *Hepatozoon canis* infecta un amplio rango de mamíferos como lo son el chacal, hiena, coyote, zorro, león, leopardo y gineata. Además, en cachorros ha sido reportada la transmisión vertical (Banet et al, 2000).

La fase sexual se desarrolla en la garrapata que se infecta inicialmente por la ingestión de sangre con monocitos y neutrófilos contaminados por isogamontes del huésped vertebrado infectado, en este momento inicia la fase de gametogonia al fecundarse el macrogameto y el microgameto, formando oocinetos; en el hemocele de la garrapata se produce la esporogonia con el resultado de numerosos esporocistos (estadio de gametocito), cada uno se replica y evoluciona (reproducción sexual) con 12 a 24 esporozoítos en su interior.

Cuando el huésped ingiere la garrapata (perro o gato) con oocistos, los cuales liberan los esporozoítos, los cuales penetran la pared intestinal y son transportados por sangre o linfa hasta células endoteliales del sistema mononuclear fagocítico (SMF) en diferentes órganos (bazo, médula ósea, nódulos linfáticos e hígado o también en músculo esquelético, miocardio o pulmones), donde se desarrolla la fase asexual llamada esquizogonia (o también llamado merogonia), donde la esquizogonia da lugar al desarrollo de macroesquizontes y de microesquizontes en los que se formarán los macromerozoítos y micromerozoítos. En especial los neutrófilos, pero también los monocitos, se infectan al fagocitar los micromerozoítos o al ser penetrados directamente por ellos para la gametogénesis. Una vez dentro, evolucionan a gametocitos y el ciclo vuelve a iniciarse cuando una garrapata ingiere los leucocitos infectados (Cummings et al, 2005)

Ciclo Biológico



Fuente: De castro, Azevedo, O'Dwyer, 2013

El canino debe ingerir la garrapata, en presencia de ácidos presentes en saliva y estomago se rompen el hemocele de la garrapata liberando su contenido para infectarse, por lo tanto, no se infecta por medio de la saliva o glándulas salivares provenientes de la garrapata. El periodo

de incubación oscila entre dos a cuatro semanas, el periodo de prepatencia es de cuatro a seis semanas y la patencia posiblemente varios años. Los esporozoítos penetran la pared intestinal causando daños epiteliales, en las células endoteliales del músculo esquelético, miocardio, pulmones, bazo, nódulos linfáticos e hígado; en este estadio los parásitos pueden persistir en las células como estructuras quísticas durante un tiempo variable sin inducir respuesta inflamatoria alguna. Sin embargo, cuando los micromerozoítos se liberan ocurre una respuesta inflamatoria granulomatosa que produce dolor y la replicación alrededor de los huesos y provoca una marcada reacción perióstica engrosando las superficies óseas (Arcila et al 2005).

En los órganos afectados se observa aumento de tamaño por lesiones vasculares por la degeneración fibrinoide de los vasos, mineralización y proliferación de la intima vascular, presencia de granulomas parasitarios y piogranulomas, infiltrado celular, depósito de sustancia amiloide crónica en los diferentes órganos (amiloidosis), vasculitis, glomerulonefritis o glomerulonefritis mensagioproliferativa, trombosis y necrosis (Ardila et al 2005)

La inmunosupresión causada por agentes infecciosos o no infecciosos tiene un impacto en la patogénesis de la infección por *Hepatozoon*, incluso en posibles reinfecciones. Los tratamientos con inmunosupresores como la prednisolona son recomendados en parasitemias altas, en la literatura se encuentra a menudo las coinfecciones de *H. canis* con otros patógenos como parvovirus (Hervas et al, 1995), *Ehrlichia canis* (Gevrey, 1993), *Toxoplasma gondii* (Harmelin et al, 1992), y *Leishmania infantum* (Riux et al, 1954)

7.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico en animales con infección crónica por medio del extendido sanguíneo visto en el microscopio a 100X es complicado; debido a que las células afectadas pueden ser sólo una o dos por cada 1000 leucocitos, por lo tanto, el examen del frotis debe realizarse en forma exhaustiva poder verlas, de esta manera en el extendido sanguíneo se observan neutrófilos y/o monocitos parasitados con los gametocitos del *Hepatozoon canis*, este puede ser coloreado con *Wright*, *Giemsa*, *Hemacolor*, *Diff-Quik* o *Naphthol- ASD-chloroacetate esterase*, donde los gametocitos adoptan una coloración azul brillante, de forma alargada, rectangulares que miden de 8 a 12 μm (en promedio 11.42 μm) de largo por 3 a 6 μm (en promedio 5.36 μm) de ancho, con un área total de 45.88 μm^2 y un perímetro promedio de 28.92 μm (Mercer et al, 1988)

En el hemograma la mayoría de los casos se observa leucocitosis neutrofílica (20.000 a 200.000 células/ μl) con desvío a la izquierda; una concentración leucocitaria (promedio de

85.700 células/ μ l) fue reportada en un estudio retrospectivo, en algunos perros se detecta eosinofilia marcada y anemia regenerativa, trombocitopenia (Craig et al, 1988).

Adicionalmente se puede encontrar hipoalbuminemia, hipoglucemia, proteinuria e incremento de las actividades de la fosfatasa alcalina y creatina cinasa LDH, CPK y AST (GOT), estos signos pueden ocurrir dentro de un año o en varios años (Ardila et al 2007)

Un método útil para establecer el diagnóstico es la biopsia ganglionar que se le realiza una impronta y se tiñe con Giemsa; la biopsia muscular o hepática con la que se elabora inclusiones de parafina, cortes histológicos y tinción con hematoxilina-eosina; con el fin de hallar en las dos técnicas para biopsias quistes con microesquizontes en desarrollo, de aproximadamente 250-500 μ m de diámetro (Ardila et al, 2007)

El paciente severamente afectado llega al punto en que los músculos inician una inflamación y se afectan los huesos pueden verse cambios en las radiografías por los trastornos del perióstio, consecuencia de la inflamación muscular en la zona de inserción (Ardila et al, 2007)

Los anticuerpos generados contra el parásito pueden ser detectados en el suero de perros clínicamente enfermos, sin embargo no hay evidencias certeras acerca de la inmunidad protectora que ellos ofrecen, dentro de las técnicas diagnósticas estudiadas se han analizado muestras de suero con la prueba de inmunofluorescencia de anticuerpos indirecta (*IFA*) para anticuerpos reactivos de IgG con antígenos de *H. canis* (Banet, 2000); también se ha estudiado con pruebas de reacción en cadena de polimerasa (*PCR*) (Alves, 2005); *Western immunoblotting* en suero canino anti-*H. canis* y suero anti-*H. americanum* contra gamontes de *Hepatozoon canis*, donde la secuencia del análisis de 368 bases cerca al extremo del gen 18S rRNA de cada especie revela una diferencia en los pares de un 13.59% (Paludo, 2005) la prueba de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y fijación de complemento (*FC*) es altamente sensible y detecta antígenos en sangre periférica (Ardila et al, 2007)

8. Variables de estudio

- Absorbancia 260/280 de ADN extraído
- Absorbancia 260/230 de ADN extraído
- Determinar el ct de la PCR tiempo real
- Concentración del material genético extraído por ambos métodos Kit DNA Isolation DNeasy Blood & Tissue Kits – QIAGEN y Salting out con modificaciones.

9. Diseño metodológico: Tipo de estudio, muestra, población, unidades de estudio. Descripción de los procedimientos a seguir. Análisis de los datos generados en términos estadísticos.

9.1 Tipo de Estudio: Experimental

9.2 Unidades de estudio

-Ct (ciclo de cuantificación): Se calculará el Ct o Cq según el threshold que se trace dependiendo la fluorescencia emitida por el termociclador

-Absorbancia: Se medirán absorbancias 260 – 230 – 280 para determinar las relaciones que existen en ellas y así calcular los coeficientes que validan si el material genético esta libre de proteínas, libre de sales, alcoholes y compuestos orgánicos.

9.3 Materiales y métodos

9.3.1 Modelo de referencia de extracción de ADN por Salting out

Siguiendo el protocolo de Riera (2010), se procede a realizar la estandarización del método de extracción de ADN a partir de sangre con EDTA, se inicia con grandes volúmenes y finaliza con pequeños volúmenes de muestra sanguínea, así mismo, se realizaron modificaciones debido a la presencia excesiva de sacarosa, se eliminaron dos pasos de lavados con solución lisis glóbulos rojos reemplazando por lavados de agua tipo molecular, el primer lavado para producir lisis de glóbulos rojos y la última para eliminar el exceso de sacarosa debido a que se perdida de vista el botón de células, cambios en la concentración del SDS para mejorar la lisis proteica (Dodecil sulfato) se aumento la concentración de SDS, se paso de 10% al 20%, cambios en el volumen de adición de etanol para mejorar la precipitación, cambios en el secado del ADN para mejorar el rendimiento del mismo en la cual se realiza en un bloque térmico a 56 grados por 5 minutos, luego se procede a hidratar con agua tipo molecular, cambios en la solución de precipitación eliminando el acetato de potasio por cloruro de Sodio el cual actúa mejor precipitando proteínas creando caos usándolo al 5M, cambios en la cuantificación del material genético eluyendo con agua destilada y desionizada. Por tanto, se describe en el siguiente párrafo el protocolo original de Riera (2010) Ver anexos, Tabla 1. que se tomo en cuenta para la estandarización y seguido de ello se presenta el protocolo con sus modificaciones.

9.3.2 Protocolo de Extracción de ADN por Salting out modificado

Se agregaron 1000ul de agua destilada estéril desinoizada (en el protocolo original se realiza con solución lisis glóbulos rojos con 500uL), luego se adicionaron 200ul de sangre total con EDTA, aplicando vórtex por 10seg dejando en gradilla a temperatura ambiente durante 3 minutos, se centrifugó 13400 xg por 2 minutos, se descarta el sobrenadante y luego se agregó 500ul solución lisis glóbulos rojos (TRIS HCl 10mM, Triton 1X, sacarosa 11%) se mezcló vigorosamente por inversión dando vórtex por 20seg o hasta disolver el pellet, se centrifugó

13400 xg por 2 minutos, luego se agregó 500ul solución lisis glóbulos rojos mezclando vigorosamente por inversión y dando vórtex por 20seg o hasta disolver botón, luego se centrifugó a 13400 xg por 2 minutos descartando el sobrenadante, se agregó 500ul de agua destilada estéril desionizada mezclando vigorosamente por inversión y dando vórtex por 20seg o hasta disolver botón, se centrifugó 13400 xg por 2 minutos luego se descartó el sobrenadante, (en el protocolo original no realizan este paso, siendo abundante la presencia de sacarosa en la solución), se agregó 180ul solución lisis glóbulos blancos (TRIS HCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM), 30ul de solución proteinasa K (20mg/mL), 20ul de SDS al 10% (en el protocolo original usan solo 10uL de SDS al 10%), se colocó en bloque térmico a 37°C durante 1 hora, dando vórtex cada 20 min. (la temperatura depende de la enzima proteinasa que se utilice, se centrifugó a 16100xg por 3 segundos, se colocó en el bloque congelado durante 3 min, centrifugar 16100xg por 3 segundos, luego se agregó 90ul de NaCl 5M, mezclando 20 veces por inversión dando vórtex por 20 segundos, se centrifugó 13400 xg por 5 minutos. (en el protocolo original crean caos proteico es con Acetato de Sodio 3M)

Se pipetearon 20ul de NaCl 5M en un nuevo vial luego se paso el sobrenadante (alrededor de 300ul), mezclando 10 veces por inversión, dando vórtex por 20seg, luego se colocó en el bloque congelado a temperatura ambiente por 3 minutos, dando vórtex por 20 segundos, centrifugar 13400 xg por 5 minutos. se pipeteo 300ul de Etanol al 99.9% se agregó el sobrenadante del vial centrifugado (alrededor de 300ul), se mezcló 5 veces por inversión y se observo el ADN a contra luz, en caso de no ver ADN, se coloca el vial en el congelador de ADN a -20°C durante 5 minutos, centrifugar a 16100rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante (en el protocolo original usan 500uL de etanol, pero con 300uL es suficiente), se adicionó 300ul Etanol al 70%, y se desprendió el botón ADN ubicado al fondo del vial con suaves golpes, luego se centrifugó 16100xg por 3 min, se descartó el sobrenadante de manera cuidadosa. Se agregaron 300ul etanol al 70%, **SIN DESPRENDER EL BOTON DE ADN** ubicado al fondo del tubo sin perderlo de vista, se centrifugó 16100rpm por 3 min, se descarto el sobrenadante de manera cuidadosa, se colocó el vial boca abajo sobre una servilleta durante 5 minutos a temperatura ambiente, manteniendo una distancia entre viales para evitar contaminaciones cruzadas.

Se colocó el vial que contiene el ADN en el bloque térmico o baño seco a 56°C eluyendo de inmediato con 150ul de agua destilada y desionizada en caso de obtener poco ADN se deberá eluir en solo 75ul de agua destilada y desionizada, luego se aplicó vórtex durante 15 segundos y se dejó 15 minutos en el bloque térmico o baño seco a 56°C, dando vórtex cada 5 minutos Se tomaron 50ul de ADN para cuantificar en espectrofotómetro

Se tomó nota del dato que reporta el espectrofotómetro de la relación 260/280 (Valor si unidades ya que es una relación de dos absorbancias), así mismo de la relación 260/230 para así evaluar la integridad del ADN obtenido. La concentración ideal para agregarle a la PCR es menor a 33ng/ul, en caso de obtener concentraciones mayores se aplicó la siguiente fórmula para poder ajustar la concentración deseada:

Concentración (C1): Valor obtenido en el espectrofotómetro expresado en ng/ul

Concentración (C2): Concentración adecuada de DNA para la PCR

Volumen (V1): Volumen que contenido en el vial después de haber sacado los 50ul de cuantificación.

Volumen (V2): Volumen a agregar al vial para obtener la concentración deseada (33ng/ul)

$$C1*V1=C2*V2$$

$$V2= ((C1*V1) /C2)-V1$$

V2= Volumen a agregar al vial.

Se pipeteo el volumen V2 obtenido en el paso anterior, para obtener la concentración deseada (menor a 33ng/ul) necesaria para la PCR

9.3.3 Protocolo de extracción DNA Isolation DNeasy Blood & Tissue Kits – QIAGEN

- a. Se pipeteó 100ul de sangre total con EDTA
- b. Se agregó 120ul de PBS, 20ul de proteinasa K, 200ul buffer AL, dar vortex durante 10seg.
- c. Se colocó en plancha a 56°C durante 10 min.
- d. Se centrifugó a 6000xg por 5 seg.
- e. Se agregó 200ul de Etanol al 99.9%, mezclar vigorosamente por inversión y dar vortex.
- f. Se transfirió el lisado a la columna ya preparada, centrifugar a 6000xg por 1min, (descartar tubo con el líquido)
- g. Se pasó la columna en un nuevo tubo de 2mL, agregarle 500ul de Buffer AW1, centrifugar a 6000xg por 1 min (descartar tubo con el líquido)
- h. Se pasó la columna a un nuevo tubo de 2mL, agregarle 500ul de Buffer AW2. centrifugar a 17000xg por 3 min (descartar tubo con el líquido)
- i. Se pasó la columna a un nuevo tubo de 2mL, centrifugar a 6000xg por 1 min
- j. Se pasó la columna a un nuevo vial de 1,5mL, agregarle 150ul de Buffer de elución, incube 1 min a temperatura ambiente
- k. Se centrifugó a 6000xg por 1 min
- l. Se procedió a cuantificar y posterior a ello a realizar PCR.

9.3.4 Diseño Primers – Sonda *Hepatozoon canis* – *Ehrlichia sp*, Control interno de amplificación Gadph.

Para el diseño Bioinformatico de Primers se uso el gen que codifica para el RNA ribosomal 18S de *Hepatozoon canis* de las secuencias de GenBank [KU893127.1](#) [KU893125.1](#) [KU893124.1](#) [KU893123.1](#) [KU893122.1](#) [KU893121.1](#) [U893119.1](#) [KX816958.1](#). Para *Ehrlichia sp* se uso el gen que codifica para la proteína TRAG de las diferentes especies de *Ehrlichia*, las secuencias completas de GenBank que se usaron son las siguientes; [CP000107.1](#), [CP025749.1](#), [CP007480.1](#), [CP007479.1](#), [CP007478.1](#), [CP006917.1](#). Para el diseño del control interno de amplificación según los MIQE (minimal information Quantification Experiment) (Bustin et al 2010), recomiendan usar un gen de normalización el cual debe amplificar ya que es un gen constitutivo, que sirve para evidenciar si la reacción fue inhibida por agentes externos. Por tanto se tomo una región del ADN que codifica para el RNA

mensajero de GADPH, las siguientes secuencias de GenBank se tomaron en cuenta, [XM_003435649.4](#), [XM_014109964.2](#), [M_014109408.2](#), [XM_014119013.2](#), [DQ403061.1](#), [NM_001009307.1](#), [XM_006933438.3](#)

Las cuales se alinearon en el programa Bioedit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), allí mismo se realizó un alineamiento múltiple con Clustal W, seguido de obtener la secuencia consenso, identificando la región con baja variabilidad, se procede a cortar la secuencia de interés llevando al software de diseño de primers llamado primer3plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) en donde se parametrizo para que los primers amplifiquen a 60°C y se le da la orden de crear una sonda específica entre los primers, la cual se va a pegar a 70°C.

Luego de que el software saca los primers - sonda, se procedió a realizar Blast local y Blast general en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en el cual se observa la homología con otras secuencias y (de) otras especies, así mismo se realizó uno a uno con el forward, reverse y la sonda. Luego se verifico que *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia sp* se encuentre entre las primeras posiciones con homologías del 99%, se introducen en el software Oligo analizar, el cual muestra que no se peguen entre ellos (Primers – Sonda), la energía libre de Gibbs debe estar menor a -8 Kcal/mol, luego se procede a enviar a síntesis en MACROGEN (<https://dna.macrogen.com>), la sonda se marca en el extremo 5 prima con el floro foro FAM (6- Carboxifloresceina), y el Quencher que apaga la señal de la sonda va en el extremo 3 prima, se marco con BHQ (Black Hole Quencher).

9.3.5 Validación de la PCR simplex tiempo real y múltiplex punto final

Se valido la PCR múltiplex y convencional, en dúplex y sencilla usando enzimas optimizadas por Qiagen tales como la top taq polimerasa®, Quantinova Sybr Green I ®y Quantinova probe®, los cuales se encuentran en el handbook de Qiagen. En donde se realizaron variaciones, tales como; aumento en el tiempo de desnaturalización inicial (5 minutos), aumento en el tiempo de desnaturalización en el ciclado (10 segundos), y anillamiento – extensión 30 segundos.

9.3.6 Protocolo PCR *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia sp* y *Gadph* con Top Taq polimerasa Qiagen

Las master mix preparadas fueron ensayadas con rigurosidad hasta obtener fragmentos únicos, las cuales se logran gracias a la optimización realizada por la casa comercial Qiagen, solo se modifican cantidades de ADN agregados a la PCR (90ng) (Ver Tabla No 2, No 8 en anexos)

9.3.6.1 Condiciones del Termociclador Simplyamp Applied biosystem de Thermofisher

Según las recomendaciones del fabricante de la enzima Top taq polimerasa de Qiagen se programa el termociclador, llevándolo a 35 ciclos para evitar dímeros de primers. (Ver Tabla No 3 en anexos). Luego se procede a realizar el gel de agarosa al 2,5% y se corren en Buffer TBE 1X, con 100 voltios durante 45 minutos.

9.3.7 Protocolo qPCR *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia sp*, *Gadph* con Quantinova Syber Green I Qiagen (Ver Tabla No 10 en anexos)

Las master mix preparadas fueron ensayadas con rigurosidad hasta obtener fragmentos únicos, las cuales se logran gracias a la optimización realizada por la casa comercial Qiagen, solo se modifican cantidades de ADN agregados a la PCR (90ng)

9.3.7.1 Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen (Ver Tabla No 11, No 12, No 13, No 14, No 15 en anexos.)

Según las recomendaciones del fabricante de la Quantinova Sybr Green I de Qiagen se programa el termociclador, llevándolo a 40 ciclos, modificando el tiempo de desnaturalización inicial a 5 min, extendiendo a 10 segundos la desnaturalización del ciclo y por último adicionando 20 segundos más, ósea 30 segundos en anillamiento –extensión. Para el paso de melting se siguen las instrucciones del fabricante.

Luego se Observan en el software del Rotor Gene Q, en Analysis – Cuantitation - Green, seguido de ellos se analiza la curva melting en Analysis – Cuantitation – Melt, luego se determina el t_m (temperatura melting) y se compara con el t_m recomendado según el fragmento en el software uMelt en la pagina de la universidad de Utah (<https://www.dna.utah.edu/ua/uanalyze.html>), el valor del t_m debe ser muy cercano al que ellos calculan.

9.3.8 Protocolo qPCR *Hepatozoon canis* con Quantinova Probe Qiagen (Ver Tabla No 16, No 17, No 18, No 19, No 20 en anexos)

Las master mix preparadas fueron ensayadas con rigurosidad hasta obtener fragmentos únicos, las cuales se logran gracias a la optimización realizada por la casa comercial Qiagen, solo se modifican cantidades de ADN agregados a la PCR (90ng)

9.4 Secuenciación de Fragmentos

Luego de tener los amplicones en tubos de PCR, se envía a MACROGEN para purificar y Secuenciar dichos fragmentos obtenidos por PCR punto final en el termociclador Applied Biosystem de Thermofisher, se envían los fragmentos por separado.

10 Consideraciones éticas del proyecto

Para la ejecución del presente proyecto, se toma en cuenta que las muestras de sangre extraídas provienen de Exámenes solicitados por propietarios de mascotas en las veterinarias que posteriormente estas contactan al laboratorio MASCOLAB, quien es el que finalmente guarda las muestras. No existiendo conflictos de interés.

11 RESULTADOS

11.1 Cuantificaciones de extracción de ADN por Salting out Modificado (Espectrofotómetro Eppendorf)

Tras realizar 123 extracciones (Ver Tabla No 22) se obtuvieron los siguientes promedios;

Promedio concentración: 93,89 ng/uL

Promedio R 260/280: 1,74

Promedio R 260/230: 2,73

La concentración obtenida en promedio es de 93,89ng/uL la cual depende directamente de la cantidad de leucocitos y de parásitos que tenga el paciente, así mismo, se logró tener una relación de absorbancia 260/280 de 1,74 indicando que el ADN obtenido es libre proteínas y/o compuestos aromáticos, por otra parte la relación de absorbancia 260/230 mostró ser la ideal 2,73, la cual indica que el ADN se encuentra libre de sales y/o compuestos orgánicos.

11.2 Cuantificaciones Kit DNA Isolation DNeasy Blood & Tissue Kits – QIAGEN (Espectrofotómetro Eppendorf)

La validación del método comparativo se obtuvieron las siguientes promedios (Ver Tabla No 23)

Promedio concentración: 35,12 ng/uL

Promedio R 260/280: 1,76

Promedio R 260/230: 1,66

Los datos obtenidos muestran que la validación realizada por Qiagen es confiable y sirve como referencia cuando se están realizando validaciones de nuevos métodos como el de Salting out modificado, estandarizado en el presente documento.

Comparación KIT Vs Santing out diferentes muestras de Sangre con EDTA

Promedios obtenidos por los diferentes métodos de extracción (Ver Tabla No 24 en anexos)

Ambos métodos de extracción muestran relaciones 260/230 y 260/280 favorables para la aceptación del material genético extraído, pero se observa que el mejor rendimiento lo da la extracción de Salting out modificado, obteniéndose una concentración de 93,89ng/uL

Comparación KIT Vs Salting out la misma muestra (Sangre con EDTA) por triplicado (**Ver Tabla No 25 en anexos**)

Al realizar la extracción de ADN con ambos métodos por triplicado se observa que se obtiene mejor rendimiento con el método Salting out modificado, así mismo las relaciones 260/280 y 260/230 mostraron que el ADN obtenido por Salting out modificado es de alta calidad comparado con el método de extracción de Qiagen.

11.3 Criterios de aceptación de DNA extraído

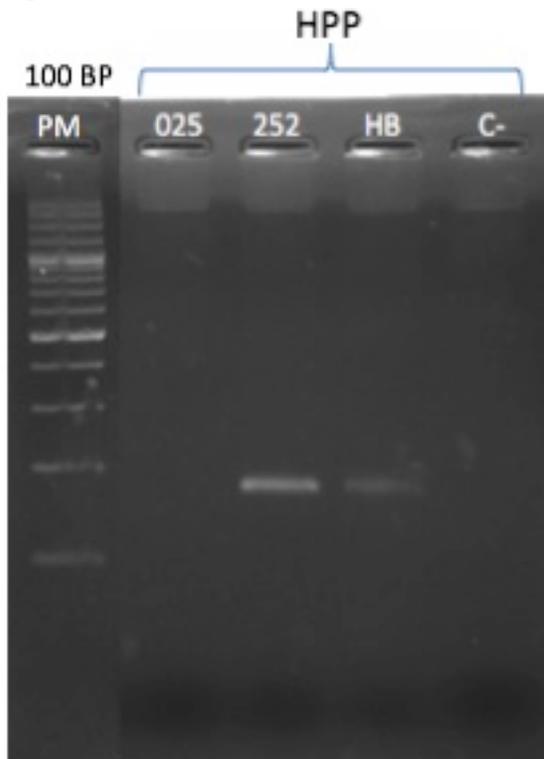
Según Glasel (1995) describe como criterio de aceptación de DNA de buena calidad y cantidad dependiendo los siguientes criterios: (Ver tabla No 27), en donde el ADN a obtener debe tener una relación 260/280 de 1.8 – 2.0, valores inferiores, indican que el ADN podría estar contaminado por compuestos aromáticos y valores superiores podrían indicar que el ADN está contaminado con RNA, así mismo si la relación 260/230 se encuentra inferior a 1.5 el ADN presenta sales.

11.4 Diseño Primers *H. canis*

<i>Ehrlichia sp</i>	PFEhrlw 5' - TGAGTTCATTCCTGCTTCTTCA-3' PREhrlw 3' TGGATGAGTTTCCAACATTAGG-5'	FAM 5' - CCACGGAAATATGCG ATACCTGTTTGA- 3' BHQ1
<i>Hepatozoon canis</i>	PFHepw 5' - AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3' PRHepw 3' - CCCAACTGTCCCTATCAATCA-5'	FAM 5' - AGAGTGTTTCTAGCA GGCCAACGCTT- 3' BHQ1
<i>Control interno Gadph</i>	GADPf 5' - AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3' GADPr 3' - TACTCAGCACCAGCATCACC-5'	HEX 5' - CGAGATCCC GCCAACATCAAATG- 3'

11.7. Reportes Geles de Agarosa al 2,5%, 100v/45min. de la PCR *H.canis* con la enzima top taq polimerasa de Qiagen en el termociclador simplyamp de Applied Biosystem de Thermofisher, el fragmento amplificado es de 192pb con la top taq polimerasa de Qiagen concordando con lo esperado.

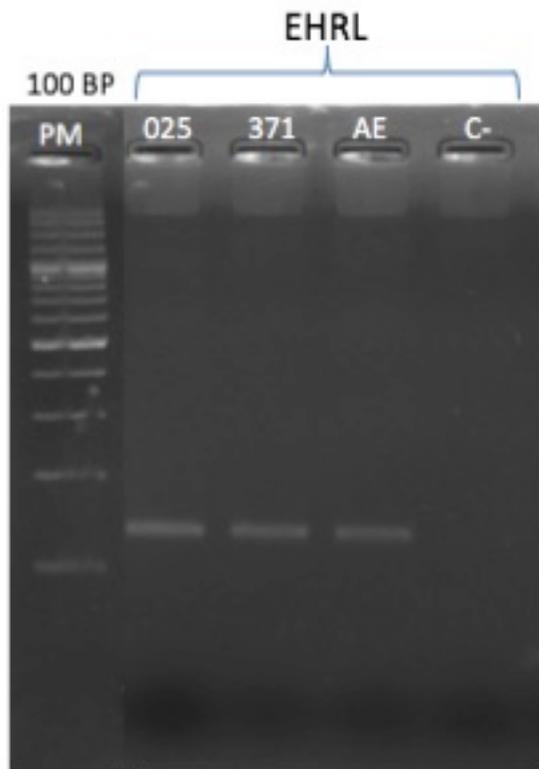
Figura 10.



HPP: PCR punto final *H. canis*, Tamaño del fragmento: 192Pb, Pozo 1. Marcador de Peso Molecular (Escalera de 100Pb). Pozo 2 Muestra 025 (Negativo para *H. canis*), Pozo 3. Muestra 252 (Positivo para *H.canis*). Pozo 4. Muestra HB (Positivo para *H.canis*). Pozo 5 C- control negativo.

11.8 Reportes Geles de Agarosa al 2,5%, 100v/45min. de la PCR *Ehrlichia sp* con la enzima top taq polimerasa de Qiagen en el termociclador simplyamp de Applied Biosystem de Thermofisher. el fragmento amplificado es de 143pb con la top taq polimerasa de Qiagen concordando con lo esperado.

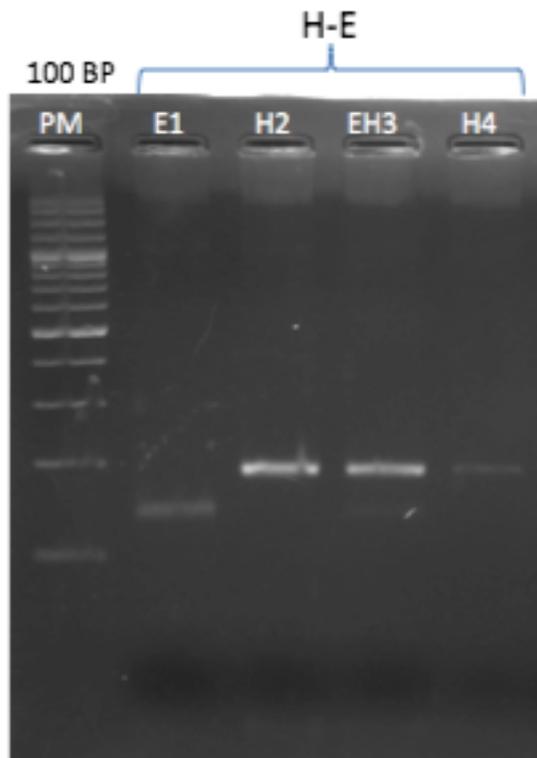
Figura 11.



EHRL: PCR punto final *Ehrlichia sp*. Tamaño del fragmento: 143Pb, Pozo1. Marcador de Peso Molecular (Escalera de 100Pb). Pozo 2 Muestra 025 (Negativo para *Ehrlichia sp*), Pozo 3. Muestra 371 (Positivo para *Ehrlichia sp*). Pozo 4. Muestra AE (Positivo para *Ehrlichia sp*). Pozo 5 control negativo (Negativo)

11.9 Reportes Geles de Agarosa al 2,5%, 100v/45min de la PCR múltiplex *Ehrlichia sp* – *H. canis* con la enzima top taq polimerasa de Qiagen en el termociclador simplyamp de Applied Biosystem de Thermofisher. el fragmento amplificado es de 192pb de *H. canis* y de 143 de *Ehrlichia sp* con la top taq polimerasa de Qiagen concordando con lo esperado.

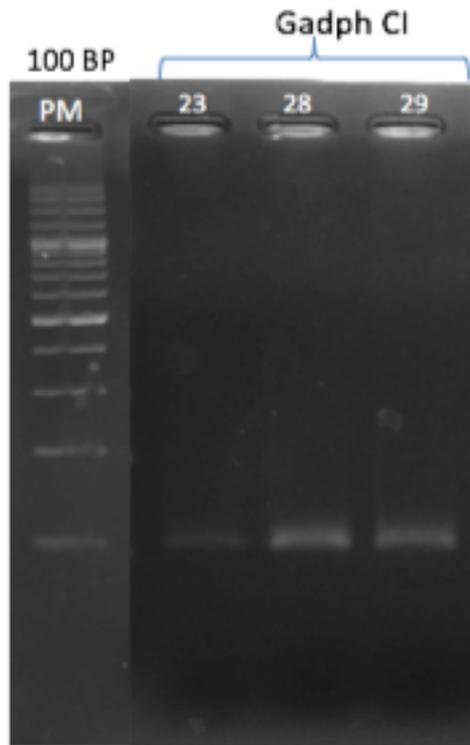
Figura 12.



H- E PCR múltiplex punto final. Tamaño del fragmento: *Ehrlichia sp* 143Pb, *H. canis* 192Pb
 Pozo1. Marcador de Peso Molecular (Escala de 100Pb). Pozo 2 Muestra E1 (Positivo para *Ehrlichia sp*), Pozo 3. Muestra H2 (Positivo para *H. canis*). Pozo 4. Muestra EH3 (Positivo para *H. canis*, y Positivo para *Ehrlichia sp*). Pozo 5. Muestra H4 (Positivo para *H. canis*)

11.10 Reportes Geles de Agarosa al 2,5%, 100v/45min de la PCR control interno *Gadph* con la enzima top taq polimerasa de Qiagen en el termociclador simplyamp de Applied Biosystem de Thermofisher

Figura 13.



Gadph CI PCR punto final Control interno. Tamaño del fragmento: *Gadph* 101Pb. Pozo1. Marcador de Peso Molecular (Escala de 100Pb). Pozo 2. Muestra 23 (Positivo a Gadph), Pozo 3. Muestra 28 (Positivo a Gadph), Pozo 4. Muestra 29 (Positivo a Gadph).

11.11 Reportes de la PCR *Ehrlichia sp* con el protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen con curva melting (**Ver Figura 14 en anexos**)

Se observa única banda limpia en la curva melting, no se observan dímeros de primers, en el eje x se observa la t_m de 77°C de disociación útil para compararla con el software uMelt el cual debe ser muy cercana la t_m , en el eje y se observa el delta fluorescence el cual indica la cantidad de fluorescencia emitida por el intercalante Sybr Green I en el momento en que se disocia el fragmento. el fragmento amplificado es de 143pb con la Quantinova Syber Green I de Qiagen concordando con lo esperado.

11.11.1 Comparación t_m Curva melting *Ehrlichia sp*, T_m de 77°C con uMelt (**Ver Figura 16 en anexos**)

Según el software uMelt el fragmento debe tener un t_m cercano a los 79 °C, el cual, el obtenido fue de 77°C perteneciendo al fragmento correspondiente.

11.12 Reportes de la PCR *H. canis* con el protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen más curva Melting (Ver Figura 17 en anexos.)

Se observa única banda limpia en la curva melting, no se observan dímeros de primers, en el eje x se observa la t_m de 76°C de disociación útil para compararla con el software uMelt el cual debe ser muy cercana la t_m , en el eje y se observa el delta florescence el cual indica la cantidad de florescencia emitida por el intercalante Sybr Green I en el momento en que se disocia el fragmento. el fragmento amplificado es de 192pb con la Quantinova Syber Green I Qiagen concordando con lo esperado.

11.12.1 Comparación t_m Curva melting *H. canis*, T_m de 76°C con uMelt (Ver Figura 18 en anexos)

Según el software uMelt el fragmento debe tener un t_m cercano a los 79 °C, el cual, el obtenido fue de 77°C perteneciendo al fragmento correspondiente.

11.13 Reportes de la PCR *H. canis* con el protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen más curva Melting (Ver Figura 19 en anexos)

Se observa única banda limpia en la curva melting, no se observan dímeros de primers, en el eje x se observa la t_m de 84°C de disociación útil para compararla con el software uMelt el cual debe ser muy cercana la t_m , en el eje y se observa el delta florescence el cual indica la cantidad de florescencia emitida por el intercalante Sybr Green I en el momento en que se disocia el fragmento.

11.13.1 Comparación t_m Curva melting control interno *Gadph*, T_m de 84°C con uMelt (Ver Figura 20 en anexos)

Según el software uMelt el fragmento debe tener un t_m cercano a los 85 °C, el cual, el obtenido fue de 84°C perteneciendo al fragmento correspondiente.

11.14 Reportes de la PCR *H. canis* con el protocolo Quantinova probe de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen (Ver Figura 21 en anexos)

Se corren PCR tiempo real con sonda en pacientes caninos provenientes de clínicas veterinarias con signos clínicos sospechosos de hemoparasitos, el cual se evidencia que la amplificación de *H. canis* con ct (Cycle threshold de 22,47 del control positivo y 32 del paciente). el fragmento amplificado es de 192pb con la Quantinova probe de Qiagen concordando con lo esperado.

11.15 Reportes de la PCR *Ehrlichia sp* con el protocolo Quantinova probe de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen Ver Figura 22 en anexos)

Se corren PCR tiempo real con sonda en pacientes caninos provenientes de clínicas veterinarias con signos clínicos sospechosos de hemoparasitos, el cual se evidencia que la amplificación de *Ehrlichia sp* con ct (Cycle threshold de 27,33 del control positivo, 34,63 del primer paciente y 27,77 del segundo paciente). el fragmento amplificado es de 143pb con la Quantinova probe de Qiagen concordando con lo esperado.

11.16 Reportes de la PCR Control interno Gadph con el protocolo Quantinova probe de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen (Ver Figura 23 en anexos)

Al realizar la PCR tiempo real del control interno de amplificación de pacientes caninos provenientes de clínicas veterinarias se observa amplificación logrando ct de 16,98 hasta 31,32 los cuales se diluyeron con el fin de lograr un limite de detección bajo dato no especificado en la investigación. el fragmento amplificado es de 101pb con la Quantinova probe de Qiagen concordando con lo esperado.

11.17 Secuenciación de Fragmentos

11.17.1 Secuenciación *Ehrlichia sp* (Ver Figura 24 en anexos)

El tamaño del fragmento *Ehrlichia sp* es de 143pb, lográndose notar en el resultado de secuenciación el cual evidencia coherencia con lo diseñado.

11.17.1.1 Blast de la Secuenciación *Ehrlichia sp* (Ver Figura 25 en anexos)

Al realizar el Blast general se evidencia homología del 95% con secuencias de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia muris*, logrando anillar secuencias de *Ehrlichia sp*

11.17.2 Secuenciación *H. canis* (Ver Figura 26 en anexos)

El tamaño del fragmento *H. canis* es de 198pb, lográndose notar en el resultado de secuenciación el cual evidencia coherencia con lo diseñado.

11.17.2.1 Blast secuenciación *H. canis* (Ver Figura 27 en anexos)

Al realizar el Blast general se evidencia homología del 99% con secuencias de *H. canis*.

11.17.3 Secuenciación Control interno Gadph (Ver Figura 28 en anexos)

El tamaño del fragmento control interno Gadph es de 101pb lográndose notar en el resultado de secuenciación el cual evidencia coherencia con lo diseñado.

11.17.3.1 Blast Secuenciación control interno Gadph

Al realizar el Blast general se evidencia homología del 96% con secuencias de *Canis lupus familiaris*

12 Discusión

La prueba gold estándar para el diagnóstico de *Ehrlichia* era Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), siendo una técnica muy dispendiosa de lectura subjetiva, con problemas de especificidad entre especies dando reactividad cruzada. Sin embargo es actualmente usada para verificar exposiciones con el patógeno determinando títulos de anticuerpos tipo IgG en combinación con la PCR resulta tener un diagnóstico definitivo de la infección (Sainz et al 2015).

A diferencia de la IFI, la PCR que es una prueba altamente sensible y altamente específica con costos bajos, útil para el diagnóstico múltiple de patógenos de manera simultánea, teniendo alta repetitividad y reproducibilidad una vez se valide, teniendo en cuenta normas que hoy en día rigen a los laboratorios de ensayo como lo es la ISO/IEC 17025 versión 2015 la cual, garantiza resultados confiables en ensayos propuestos por laboratorios de diagnóstico. Es por ello que hoy por hoy, gracias a la MIQE todos los laboratorios se ven obligados a validar ensayos que sean confiables ante un mercado sediento.

Las metodologías de extracción de ácidos nucleicos basadas en columnas de silica gel presentan una ventaja con respecto a las metodologías por salación u orgánica debido a que se obtienen ADN de mejor pureza, sin presencia de inhibidores para la PCR, el tiempo de extracción llegaría a unos 30 minutos, lo cual hace que sea la ventaja más notoria. Aunque la mayor desventaja es el precio, para algunos laboratorios no significa importancia cuando el valor de venta es alto. Sin embargo, los métodos tradicionales de extracción reflejan un alto rendimiento, y según la calidad las muestras se pueden llegar a obtener ADN con alta pureza, alcanzando altas concentraciones que no se llegarían a obtener con kits comerciales. Ahora bien, en la estandarización del protocolo salting out con modificaciones en la presente investigación se obtuvieron ADN con mejores concentraciones que el Kit de Qiagen, las relaciones 260/280 fueron similares con respecto a las del kit de Qiagen DNAeasy (S.O.M: 1,74 – Kit Q: 1,76), Relación 260/230 (S.O.M: 2,73 – Kit Q: 1,66), Se obtuvieron mejores concentración de ADN con el S.O.M: 93,89ng/ul con respecto al Kit Q: 35,12, a diferencia que lo hallado por (Poh et al 2014) que obtuvo por el mismo método de extracción Salting out una concentración de 24,33ng/ul, Cortes, 2012 obtuvo 19,48ng/uL, (Bettina, 2000) obtuvo 50,22ng/uL, en concordancia con (Eslami et al, 2017) quien concluye que el método de salting out es muy seguro para extracción de ADN de tejido comparado con métodos como el Fenol – cloformo, y Kits comerciales de los cuales obtiene mejor rendimiento con el método de salting out (Ver tabla 26 en anexos). En otro trabajo se compara el rendimiento del método de salting out con el kit comercial QIAam DNA macro kit, el cual muestra que obtiene un rendimiento de 23,8ng/uL con salting out, y 4,53ng/uL con el kit (Shaik et al, 2016). Según Maurya et al 2013 calcula el costo de 0,2USD por muestra extraída por el método de salting out obteniendo un rendimiento de 48ug/mL a partir de sangre completa comparada con el kit QIAamp que se obtuvo 35,3ug/mL, este costo mencionado por Maurya es un valor bajo en comparación con los kits comerciales, aunque, el costo estimado en la presente investigación es de 2,6USD por muestra, calculando las puntas con filtro y reactivos

usados. Es de resaltar que este método de extracción salting out depende de la cantidad de leucocitos que presenta el paciente, pero para efectos de buscar material genético de patógenos, el rendimiento no necesariamente debe ser el máximo, aunque si se obtienen cantidades mínimas de DNA problema, es probable que el número de copias por patógeno también disminuyan. Así mismo, las relaciones de absorbancia son críticas para definir la pureza del ADN extraído, En el método estandarizado en la presente investigación se obtienen relaciones aceptables para la PCR y comparadas con el kit comercial de Qiagen son muy similares (S.M.O: 260/280: 1,74 – relación 260/230: 2,73 Kit Q: 260/280: 1,76 - relación 260/230: 1,66), valor aceptado según el criterio de rechazo según (Glasel 1995). Realizando los ensayos de una misma muestra usando el mismo volumen pero con diferente método (S.M.O y kit Q) la mejor concentración de ADN fue la de S.M.O, sucediendo lo mismo con la relación 260/280 de S.M.O, en contraste, el método Salting out se obtuvieron relaciones muy altas debido a la presencia de RNA en el material genético extraído, a diferencia del método del Kit de Q, el ADN la relación 260/230 mostro aumento por encima del valor aceptado según (Glasel et al, 1995), en comparación de Poh 2014, Cortes, 2012, las relaciones 260/280 estuvieron dentro de los rangos aceptables, por otra parte Bettina, 2000 obtuvo 1,53 en la relación 260/230.

Los métodos pre – estandarizados que ofrecen las casas comerciales para la realización de PCR punto final o PCR tiempo real son de gran importancia a la hora de iniciar un proceso de estandarización ya que reducen el tiempo empleado y gasto de reactivos, teniendo en cuenta que las comercializan con concentraciones de reactivos estándar a la que ya fueron validadas, facilitando la estandarización de la PCR en cada laboratorio. En cuanto a la metodología empleada con la top taq polimerasa de Qiagen se obtuvieron bandas definidas en el gel de agarosa al 2,5%, las cuales evidencian que la PCR múltiplex no se inhibió por ningún agente externo, así mismo, como en las estandarizaciones de la PCR punto final con Top taq polimerasa que realizó (Assal et al, 2004), con fines de realizar genotipificaciones, esta enzima demuestra la capacidad de amplificar dos fragmentos en una sola PCR, sin necesidad de realizar curvas con concentraciones altas de $MgCl_2$. En la presente investigación fue necesario cambiar la temperatura de desnaturalización inicial, ya que se observa que cuando se agregan más de 90ng de ADN a la reacción la PCR se inhibía, por ende se aumento 4 minutos más, quedando 7 minutos de temperatura a 95°C. Adicional, se subió 1 grado de temperatura de desnaturalización debido a que el termociclador es mas estable con 95°C que con 94°C observándose amplificaciones más eficientes con bandas bien definidas en los geles de agarosa al 2,5%. Aunque (Alonso et al 2017) logro estandarizar la PCR punto final con la misma enzima (Top taq polimerasa de Qiagen), con tiempos de anillamiento y extensión de 15 segundos, lo cual confirma que la enzima es de alta reproducibilidad para las PCR múltiplex

En cuanto al protocolo de la Quantinova Syber Green de Qiagen, no se evidenciaron dimeros de primers los cuales son frecuentes en la PCR tiempo real con Syber Green, haciendo dificultosa la interpretación debido a que se debe tener en cuenta la curva melting para calcular el t_m y compararlo con el software uMelt y estos se comportan muy similares al amplicon problema, no obstante, en cuanto al protocolo de configuración de termociclador, hubo necesidad de modificar los tiempos desnaturalización inicial cambiando a 5 minutos debido a que se busca ADN diferente del paciente, ósea ADN proveniente del patógeno, por ende, cuando el paciente presentaba pocas copias del patógeno este no amplifica, así mismo

se modifico el tiempo de desnaturalización en el ciclado (40 ciclos) aumentando 5 segundo más en comparación con el protocolo recomendado por Qiagen. En cuanto a tiempo de anillamiento – Extensión, se aumento a 30 segundos para obtener una robustez en la curva melting ya que se observaba una perdida de florescencia cuando se trabajaba con 10 segundo a 60°C. Otros autores como Garmendia en 2011 usaron la misma enzima y realizaron modificaciones para ajustar la PCR tiempo real, cambiando el tiempo de desnaturalización inicial a 10 minutos, la desnaturalización del ciclado también lo modificaron a 15 segundos y por último aumentaron el tiempo de anillamiento- extensión a 1 minuto, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la investigación.

La estandarización con la Quantinova probe se realizaron algunas modificaciones las cuales tienen las mismas explicaciones que con la Quantinova Syber Green, el tiempo de desnaturalización inicial cambio a 5 minutos, la desnaturalización en el ciclado cambio a 10 segundos, y el tiempo en anillamiento extensión cambio a 30 segundos. Coincidiendo con el protocolo usado por Sultana, 2013, quien también modifica las temperaturas de desnaturalización tanto de inicial como la del ciclado, confirmado lo mencionado anteriormente, cada investigador ajusta sus tiempos de desnaturalización ya sean los iniciales o los del ciclado.

La selección de genes específicos para identificación del genero se tomaron de revisiones en NCBI (national center biotechnology information), se seleccionó el gen que codifica para proteínas de adhesión TRAG, debido a que son secuencias conservadas dentro de los alineamientos realizados, así mismo, nuestro objetivo era identificar genero de *Ehrlichia sp*, este gen TRAG demuestra ser herramienta diagnostica para identificación de genero completo, el cual no ha utilizado en anteriores investigaciones, debido a que el objetivo de cada investigador es diferente. (Aguirre et al 2009) amplifica regiones 16S del RNAr, concluyendo que no se pueden diferenciar las especies de *Ehrlichia sp* con este gen, por ende, se hace necesaria la secuenciación.

Debido a la reactividad cruzada entre especies de *Ehrlichia* las cuales usan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a proteínas inmunoreactivas mayores como la p28, gp200, gp19 y gp36 compartidas con más especies de *Ehrlichia*. Ahora bien, muchos autores calculan la sensibilidad de las pruebas serológicas en comparación con la PCR, o Western blot, las cuales presentan discrepancias debido a que las IFI no son verdaderos positivos, a diferencia del western blot y PCR que ofrecen un diagnóstico definitivo, lo cual crean vacios en la data publicada (Nakagui et al, 2008), así mismo, el autor confirma que el diagnostico de *Ehrlichia* se confirma realizando IFI y PCR al mismo tiempo.

En cuanto el diagnostico de *H. canis*, se amplificaron secuencias de RNA ribosomal 18S altamente conservadas según (Inokuma et al, 2002), el cual presenta homología del 99%, amplificando un fragmento de 625pb por PCR, similar a nuestra validación cuyo fragmento es de 192pb, observando homología del 99%. Como herramienta diagnóstica y la única región publicada en base de datos, es de gran utilidad seguirla usando debido al porcentaje de homología que se observa después de obtener la secuenciación. Entre tanto, debido a que comercialmente no existe una prueba serológica ni molecular para la detección de *H. canis*, se hace necesaria la implantación de la PCR como herramienta diagnóstica, y más aun si se

realiza con la tecnología PCR tiempo real con sondas de hibridación, no descartando la opción económica que es la PCR múltiplex convencional, la cual detecta simultáneamente dos patógenos de mayor importancia en la clínica diaria de pequeñas especies.

Gracias a la región conservada de gen 18S de *Hepatozoon canis* se logro amplificar y secuenciar un fragmento de 192pb, pero al realizar blast en NCBI en las últimas posiciones se observa especies de *Hepatozoon felis*, y *Hepatozoon sp*, esto muestra que los primers no son 100% específicos para *H. canis*, aunque en Colombia no se han encontrado reportes de *Hepatozoon amaricaninum* ni reportes de *H. felis*, aunque en otros países si se han observado otras especies de *Hepatozoon sp* (Criado-Fornelio et al.,2006^a), siendo relevante y limitada. (Criado et al 2007). Alternativamente la secuenciación de ADN puede aportar información adicional sobre las especies de *Hepatozoon*, esto con fines de mejorar los reportes de casos y llegar hasta especie.

La nueva PCR. Múltiplex punto final y tiempo real en este estudio mostro reproducibilidad, y especificidad similar la reportada por Criado 2007 en el cual realizo qPCR *Hepatozoon sp*. La PCR tiempo real es más sensible y mas especifica al usar la tecnología sonda taqman, así mismo comparando con lo reportado en base de datos, este sería el primer trabajo en el cual se diseño, se valido una qPCR con sonda específica de detección, cabe resaltar que la PCR punto final no tiene los mismos limites de detección, no calculados en este trabajo, debido a que el el termociclador se coloca 35 ciclos como máximo para la amplificación exponencial, a diferencia de la PCR tiempo real, su ciclado máximo en este experimento fue de 45 ciclos, haciendo más visible la detección de pocas copias de los microorganismos en cuestión. Este tema es critico debido a que algunos pacientes no presentan síntomas ni signos y/o en fases tempranas de la infección, la PCR punto final se podrían negativizar debido a las bajas copias circulantes (Buling et al 2007)

Antes de año1950, la humanidad colocaba su atención en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Para ello la microbiología clínica necesita optimizar a nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez, la detección de agentes infecciosos y de sus genes de virulencia y de resistencia, lo cual permitirá ejecutar programas de prevención y tratamiento de estas enfermedades. De tal manera, gracias a la optimización de la PCR múltiple se plantea como una gran alternativa que permitirá la detección simultánea de un número cada vez mayor de dianas o fragmentos blanco, a partir de un número también creciente de tipos de muestras clínicas y necesitando una cantidad menor de ácido nucleico molde. Además, la reciente introducción de la PCR en tiempo real en el diagnóstico clínico, permitió el desarrollo de nuevos y eficientes protocolos de PCR múltiple (Alvarez et al, 2004), aplicados hoy en día en medicina veterinaria.

13 Conclusiones

Se logro validar el método de Salting out modificado con respecto al Kit comercial de extracción DNaeasy Mini kit Qiagen.

Se logro detectar *Ehrlichia sp* por PCR convecional usando el protoco de la Enzima Top taq polimerasa de Qiagen

Se valido la PCR para la detecci3n de *Ehrlichia sp* con el protocolo de la Quantinova Syber Green de Qiagen

Se logro validar la PCR para la detecci3n de *Ehrlichia sp* usando el protocolo de la Quantinova Probe de Qiagen

Se logro detectar *H. canis* por PCR convecional usando el protoco de la Enzima Top taq polimerasa de Qiagen

Se valido la PCR para la detecci3n de *H. canis* con el protocolo de la Quantinova Syber Green de Qiagen

Se logro validar la PCR para la detecci3n de *H. canis* usando el protocolo de la Quantinova Probe de Qiagen

Se implento la PCR m3ltiplex para la detecci3n de *Ehrlichia sp* y *H. canis* por PCR convencional.

Se logro evidenciar por secuenciaci3n la homolog3a de los fragmentos obtenidos con especies de *Ehrlichia p* y *H. canis*.

Las Sondas de hibridaci3n y los primers dise1ados fueron espec3ficos para la amplificaci3n de los targets tanto de *Ehrlichia sp*, *H. canis* como del Control interno de amplificaci3n Gadph.

14 Recomendaciones

Para futuras investigaciones se recomienda estandarizar m3todos de extracci3n m3s r3pidos a bajo costo, as3 mismo abandonar la tecnolog3a PCR punto final para diagn3stico implementando a su vez la PCR tiempo real con Sonda de hidrolisis que es m3s sensible y especifica.

Se recomienda estandarizar PCR tiempo real d3plex para ahorrar costos de reacciones, as3 se detectan dos pat3genos en un solo tubo. As3 mismo, cuando se empleen protocolos de casas comerciales, se deben ajustar los tiempos de desnaturalizaci3n iniciales y del ciclado ya que son importantes para la amplificaci3n de ADN con pocas copias del pat3geno problema.

15. Anexos

15.1 Tablas

Tabla No 1.

Protocolo de validación Riera 2010.

Tabla 1: Protocolo de extracción de DNA.

Muestra	Sn Gr		Buffer GB	Pkasa	SDS 20%		ACK 3M		Isopropanol		Etanol 70%	
300 ul (c)	540 ul (c)		180 ul (c)	30 ul (c)	6 ul (c)		90 ul (c)		600 ul (c)		600 ul (c)	
100 ul (c)	180 ul (c)	-Centrifugación 12000 rpm: 3'.	60 ul (c)	10 ul (c)	2 ul (c)	-Incubar 1 hora.	30 ul (c)	-Centrifugación 12000 rpm: 5'.	200 ul (c)	-Centrifugación 12000 rpm: 5'.	200 ul (c)	-Centrifugación 12000 rpm: 5'.
50 ul (c)	90 ul (c)		30 ul (c)	5 ul (c)	1 ul (c)		15 ul (c)		100 ul (c)		100 ul (c)	
25 ul (c)	45 ul (c)	-Eliminación del sobrenadante.	15 ul (c)	2,5 ul (c)	0,5 ul (c)	-Agitación con vortex cada 10'.	7,5 ul (c)	-Transferencia del sobrenadante.	50 ul (c)	-Eliminación del sobrenadante.	50 ul (c)	-Extracción del alcohol.
10 ul (c)	18 ul (c)		6 ul (c)	1 ul (c)	0,5 ul (c)		7,5 ul (c)		50 ul (c)		50 ul (c)	
5 ul (c)	9 ul (c)	-Repetición del proceso: a: 1 vez, b: 2 veces, c: 3 veces.	3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)		7,5 ul (c)	-Se repite dos veces.	10 ul (c)		10 ul (c)	-Secado. -Resuspensión.
5 ul (c)	9 ul (c)		3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)		10 ul (c)			
2,5 ul (c)	9 ul (c)		3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)		10 ul (c)			
2,5 ul (c)	9 ul (c)		3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)		10 ul (c)			
1 ul (c)	9 ul (c)		3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)		10 ul (c)			
1 ul (c)	9 ul (c)		3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)		10 ul (c)			
0,5 ul (c)	9 ul (c)		3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)		10 ul (c)			
0,5 ul (c)	9 ul (c)	3 ul (c)	0,5 ul (c)	0,5 ul (c)	7,5 ul (c)	10 ul (c)	10 ul (c)					

Abreviaturas: Sn GR: solución de lisis de glóbulos rojos; Buffer GB: buffer de glóbulos blancos; Pkasa: solución de Proteinasa K; ACK 3M: acetato de potasio 3 M.

Rev. Cienc. Tecnol. / Año 12 / Nº 14 / 2010

Tabla No 2.

Protocolo de validación PCR punto final *H. canis*.

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Taq pol	5U/uL	0,05U/uL	0,25uL	3	0,75uL
Buffer Taq- MgCl2	10x Buffer – 15mM MgCl2	1X Buffer – 1,5mM MgCl2	2,5uL	3	7,5uL
Dntp´s	2mM	200uM	2,5uL	3	7,5uL
Mix Primer F - Primer R <i>H.</i> <i>canis</i>	10uM	0,4uM	1uL	3	3uL
Agua tipo I	-	-	15,75uL	3	47,25uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			25uL		25uL cada una

Tabla No 3.

Condiciones del Termociclador Simplyamp Applied biosystem de Thermofisher

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalizacion inicial		7min.	95°C
Ciclado	35 ciclos		
	Desnaturalizacion	30seg.	95°C
	Anillamiento	30seg.	60°C
	Extensión	1min.	72°C
Extensión final		10mi.	72°C

Tabla No 4Protocolo PCR *Ehrlichia sp* con Top Taq polimerasa Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Taq pol	5U/uL	0,05U/uL	0,25uL	3	0,75uL
Buffer Taq- MgCl ₂	10x Buffer – 15mM MgCl ₂	1X Buffer – 1,5mM MgCl ₂	2,5uL	3	7,5uL
Dntp's	2mM	200uM	2,5uL	3	7,5uL
Mix Primer F - Primer R <i>Ehrl</i>	10uM	0,4uM	1uL	3	3uL
Agua tipo I	-	-	15,75uL	3	47,25uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			25uL		25uL cada una

Tabla No 5.

Condiciones del Termociclador Simplyamp Applied biosystem de Thermofisher

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		7min.	95°C
Ciclado	35 ciclos		
	Desnaturalización	30seg.	95°C
	Anillamiento	30seg.	60°C
	Extensión	1min.	72°C
Extensión final		10mi.	72°C

Tabla No 6.

Protocolo PCR múltiplex *Hepatozoon canis* – *Ehrlichia sp* con Top Taq polimerasa Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Taq pol	5U/uL	0,05U/uL	0,25uL	3	0,75uL
Buffer Taq-MgCl ₂	10x Buffer – 15mM MgCl ₂	1X Buffer – 1,5mM MgCl ₂	2,5uL	3	7,5uL
Dntp's	2mM	200uM	2,5uL	3	7,5uL
Mix Primer F - Primer R <i>H. canis</i>	10uM	0,4uM	1uL	3	3uL
Mix Primer F - Primer R <i>Ehrl</i>	10uM	0,4uM	1uL	3	3uL
Agua tipo I	-	-	14,75uL	3	44,25uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			25uL		25uL cada una

Tabla No 7.

Condiciones del Termociclador Simplyamp Applied biosystem de Thermofisher

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		7min.	95°C
Ciclado	35 ciclos		
	Desnaturalización	30seg.	95°C
	Anillamiento	30seg.	60°C
	Extensión	1min.	72°C
Extensión final		10min.	72°C

Tabla No 8.

Protocolo PCR control interno Gadph con Top Taq polimerasa Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Taq pol	5U/uL	0,05U/uL	0,25uL	3	0,75uL
Buffer Taq-MgCl ₂	10x Buffer – 15mM MgCl ₂	1X Buffer – 1,5mM MgCl ₂	2,5uL	3	7,5uL
Dntp's	2mM	200uM	2,5uL	3	7,5uL
Mix Primer F - Primer R <i>Gadph</i>	10uM	0,4uM	1uL	3	3uL
Agua tipo I	-	-	15,75uL	3	47,25uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			25uL		25uL cada una

Tabla No 9.

Condiciones del Termociclador Simplyamp Applied biosystem de Thermofisher

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
-------	-------	--------	-------------

Desnaturalización inicial		7min.	95°C
Ciclado	35 ciclos		
	Desnaturalización	30seg.	95°C
	Anillamiento	30seg.	60°C
	Extensión	1min.	72°C
Extensión final		10min.	72°C

Tabla No 10.

Protocolo qPCR *Hepatozoon canis* con Quantinova Syber Green I Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Mix Quantinova Syber Green (Dntp's, MgCl ₂ , Buffer taq polimerasa, bloqueo con anticuerpo en sitio activo)	Taq pol	No especifica el fabricante	6uL	3	18uL
	Dntp's	No especifica el fabricante			
	MgCl ₂	No especifica el fabricante			
	Buffer taq	No especifica el fabricante			
Mix Primer F - Primer R <i>H. canis</i>	8uM	0,4uM	0,6uL	3	1,8uL
Agua tipo I	-	-	12,4uL	3	7,2uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			12uL		12uL cada una

Tabla No 11.

Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		5min.	95°C
Ciclado	40 ciclos		
	Desnaturalización	10seg.	95°C
	Anillamiento – Extensión	30seg.	60°C
Curva Melt	Rampla	2seg.	60-95°C Incrementos de 0,1°C

Tabla No 12.Protocolo qPCR *Ehrlichia sp* con Quantinova Syber Green I Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Mix Quantinova Syber Green (Dntp's, MgCl ₂ , Buffer taq polimerasa, bloqueo con anticuerpo en sitio activo)	Taq pol Dntp's MgCl ₂ Buffer taq	No especifica el fabricante No especifica el fabricante No especifica el fabricante No especifica el fabricante	6uL	3	18uL
Mix Primer F - Primer R <i>H. canis</i>	8uM	0,4uM	0,6uL	3	1,8uL

Agua tipo I	-	-	12,4uL	3	7,2uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			12uL		12uL cada una

Tabla No 13.

Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		5min.	95°C
Ciclado	40 ciclos		
	Desnaturalización	10seg.	95°C
	Anillamiento – Extensión	30seg.	60°C
Curva Melt	Rampla	2seg.	60-95°C Incrementos de 0,1°C

Tabla No 14

Protocolo qPCR *Gadph* con Quantinova Syber Green I Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Mix Quantinova Syber Green (Dntp's, MgCl ₂ , Buffer taq polimerasa, bloqueo con anticuerpo en	Taq pol Dntp's	No especifica el fabricante No especifica el fabricante	6uL	3	18uL

sitio activo	MgCl ₂	No especifica el fabricante			
	Buffer taq	No especifica el fabricante			
Mix Primer F - Primer R <i>Gadph</i>	8uM	0,4uM	0,6uL	3	1,8uL
Agua tipo I	-	-	12,4uL	3	7,2uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			12uL		12uL cada una

Tabla No 15.

Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		5min.	95°C
Ciclado	40 ciclos		
	Desnaturalización	10seg.	95°C
	Anillamiento – Extensión	30seg.	60°C
Curva Melt	Rampla	2seg.	60-95°C Incrementos de 0,1°C

Tabla No 16

Protocolo qPCR *Hepatozoon canis* con Quantinova Probe Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total

Mix Quantinova Syber Green (Dntp's, MgCl ₂ , Buffer taq polimerasa, bloqueo con anticuerpo en sitio activo)	Taq pol	No especifica el fabricante	6uL	3	18uL
	Dntp's	No especifica el fabricante			
	MgCl ₂	No especifica el fabricante			
	Buffer taq	No especifica el fabricante			
Mix Primer F - Primer R - Sonda <i>H. canis</i>	8uM primers-4uM Sonda	0,4uM primers - 0,2uM Sonda	0,6uL	3	1,8uL
Agua tipo I	-	-	12,4uL	3	7,2uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			12uL		12uL cada una

Tabla No 17

Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		5min.	95°C
Ciclado	40 ciclos		
	Desnaturalización	10seg.	95°C
	Anillamiento - Extensión	30seg.	60°C

Tabla No 18

9.3.16 Protocolo qPCR *Ehrlichia sp* con Quantinova Probe Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Mix Quantinova Syber Green (Dntp's, MgCl ₂ , Buffer taq polimerasa, bloqueo con anticuerpo en sitio activo)	Taq pol	No especifica el fabricante	6uL	3	18uL
	Dntp's	No especifica el fabricante			
	MgCl ₂	No especifica el fabricante			
	Buffer taq	No especifica el fabricante			
Mix Primer F - Primer R - Sonda <i>Ehrl</i>	8uM primers- 4uM Sonda	0,4uM primers - 0,2uM Sonda	0,6uL	3	1,8uL
Agua tipo I	-	-	12,4uL	3	7,2uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			12uL		12uL cada una

Tabla No 19

Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		5min.	95°C
Ciclado	40 ciclos		
	Desnaturalización	10seg.	95°C
	Anillamiento - Extensión	30seg.	60°C

Tabla No 20

Protocolo qPCR control interno Gadph con Quantinova Probe Qiagen

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Número de veces	Total
Mix Quantinova Syber Green (Dntp's, MgCl ₂ , Buffer taq polimerasa, bloqueo con anticuerpo en sitio activo)	Taq pol	No especifica el fabricante	6uL	3	18uL
	Dntp's	No especifica el fabricante			
	MgCl ₂	No especifica el fabricante			
	Buffer taq	No especifica el fabricante			
Mix Primer F - Primer R - Sonda Gadph	8uM primers-4uM Sonda	0,4uM primers - 0,2uM Sonda	0,6uL	3	1,8uL
Agua tipo I	-	-	12,4uL	3	7,2uL
ADN	-	33ng/ul	3uL	-	
Total			12uL		12uL cada una

Tabla No 21

Condiciones del termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM Qiagen

Pasos	Pasos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		5min.	95°C
Ciclado	40 ciclos		
	Desnaturalización	10seg.	95°C
	Anillamiento - Extensión	30seg.	60°C

Tabla No 22

Cuantificaciones Salting out Modificado (Espectrofotometro Eppendorf)

Concentración (ng/ul)	R 260/280	260/230
1. 75.2	1.83	2.13
2. 100.4	1.71	1.70
3. 26.7	1.35	0.35
4. 123.4	1.74	2.13
5. 91.0	1.47	1.22
6. 61.0	1.59	1.23
7. 90.3	1.78	1.57
8. 51.8	1.88	1.11
9. 85.5	1.81	4.12
10. 117.7	1.47	2.80
11. 85.7	1.78	7.68
12. 81.1	1.65	3.85
13. 95.2	1.79	6.79
14. 91.8	1.80	9.79
15. 64.4	1.73	5.71
16. 62.4	1.78	---
17. 90.0	1.78	8.21
18. 126.5	1.79	4.44
19. 35.2	1.75	----
20. 26.1	1.72	-+-
21. 12.3	1.44	0.18
22. 79.1	2.01	--
23. 92.7	1.57	21.9
24. 13.0	1.32	---
25. 101	85	14
26. 75.5	1.72	0.24
27. 100.1	1.70	2.13
28. 30.2	6.87	---
29. 39.2	7.61	---
30. 64.2	1.87	5.09
31. 135.3	1.61	2.61
32. 81.6	1.86	2.70
33. 87.8	1.89	2.72
34. 37.4	1.73	7.78
35. 60.0	1.62	3.35
36. 56.3	1.82	4.75
37. 72.3	1.81	3.70
38. 76.1	1.83	---
39. 73.1	1.79	----

40. 55.1	1.81	---
41. 73.2	1.83	2.19
42. 48	1.90	2.15
43. 135.6	1.48	1.43
44. 77.8	1.66	1.89
45. 134.6	1.73	1.61
46. 112.3	1.78	1.83
47. 73.0	1.83	1.73
48. 106.4	1.51	1.38
49. 121.9	1.74	2.13
50. 111.4	1.69	1.24
51. 109.6	1.80	1.79
52. 67.2	1.75	1.87
53. 79.7	1.82	1.42
54. 89.8	1.80	2.01
55. 94.0	1.82	1.77
56. 97.7	1.81	2.04
57. 58.0	1.83	1.56
58. 118.9	1.72	1.79
59. 119.9	1.73	1.85
60. 94.0	1.82	1.77
61. 134.5	1.68	1.84
62. 80.9	1.85	1.88
63. 134.5	1.68	1.84
64. 108.1	1.79	1.36
65. 6.3	1.33	0.78
66. 74.7	1.76	1.77
67. 43.1	1.75	1.37
68. 21.8	1.91	---
69. 136.2	1.72	2.67
70. 90.0	1.93	3.74
71. 91.0	1.90	3.20
72. 59.3	1.99	4.12
73. 59.3	2.03	4.32
74. 135.1	1.88	2.75
75. 40.8	1.53	0.87
76. 80.9	1.90	2.65
77. 69	1.82	1.57
78. 132.2	1.71	1.81
79. 86	1.41	1.81
80. 95.5	1.90	1.85
81. 62.4	1.92	1.67
82. 398.1	1.71	2.05
83. 129.9	1.57	1.58
84. 53.0	1.95	2.16

85. 77.7	1.63	1.45
86. 95.2	1.96	1.77
87. 84.8	1.97	1.73
88. 116.5	1.89	2.02
89. 81.6	1.95	2.08
90. 108.0	1.27	1.13
91. 79.8	1.92	2.17
92. 119.8	1.81	2.25
93. 126.6	1.66	1.94
94. 59.6	1.74	0.99
95. 72.6	1.92	2.14
96. 126.0	1.83	1.74
97. 98.7	1.88	1.58
98. 76.5	1.93	1.75
99. 76.5	1.93	1.75
100. 113	1.82	2.33
101. 7.9	1.69	1.48
102. 58.5	1.77	2.28
103. 48.7	1.82	2.01
104. 52	1.81	2.16
105. 69	1.78	2.19
106. 21	1.67	2.11
107. 26.5	1.76	2.06
108. 14.9	1.42	1.39
109. 15.5	1.68	2.15
110. 2.7	1.69	6.72
111. 8.6	1.23	1.50
112. 109.1	1.80	2.46
113. 42.2	1.75	2.35
114. 63.2	1.76	2.35
115. 102.0	1.64	1.97
116. 6	1.48	1.11
117. 53.5	1.70	1.70
118. 44.9	1.77	2.02
119. 102.9	1.82	2.69
120. 74.1	1.77	3.62
121. 77.1	1.71	4.62
122. 126.4	1.80	2.97
123. 138.2	1.68	2.65

Tabla No 23

Cuantificaciones Kit DNA Isolation DNeasy Blood & Tissue Kits – QIAGEN
(Espectrofotometro Eppendorf)

Concentración (ng/ul)	R 260/280	260/230
124. 58.1	1.14	0.46
125. 83.0	2.01	1.59
126. 63.4	1.75	2.43
127. 25.6	0.15	0.10
128. 47.8	1.24	0.45
129. 26.7	1.64	0.62
130. 43.4	1.69	0.80
131. 45.2	1.70	5.59
132. 18.7	1.40	4.67
133. 56.7	1.77	----
134. 27.1	1.56	----
135. 48.7	2.45	---
136. 51.4	1.67	0.94
137. 12.9	3.25	---
138. 16.0	5.13	---
139. 15.0	5.72	----
140. 2.9	0.1	----
141. 10.1	0.8	---
142. 9.2	2.67	0.45
143. 36.6	1.39	1.70
144. 49.5	1.86	33.3
145. 49.8	1.81	----
146. 8.5	1.72	---
147. 2.7	--	---
148. 49.5	1.86	---
149. 58.7	1.79	1.56
150. 8.5	1.51	0.55
151. 9.1	1.25	1.11
152. 111.9	1.83	1.85
153. 57.2	1.71	1.38
154. 32.2	1.68	1.22
155. 12.7	1.98	---
156. 32.2	1.65	1.43
157. 35.4	1.67	1.52
158. 31.7	1.60	1.43
159. 39.1	1.80	1.73
160. 15.1	1.57	1.11
161. 36.4	1.73	1.48
162. 24.9	1.64	1.32
163. 67.9	1.96	5.59
164. 33.9	2.12	---
165. 49.1	1.98	8.82

166.	18.8	2.28	----
167.	3.4	2.45	----
168.	34.0	1.63	0.74
169.	32.2	1.79	1.04
170.	46.0	1.95	2.09
171.	44.3	1.99	2.18
172.	34.1	1.53	0.54
173.	10.5	1.92	2.32
174.	16.2	1.77	0.49
175.	32.1	1.57	0.58
176.	61.9	1.93	1.70
177.	2.8	1.77	0.15
178.	42.7	1.50	0.56
179.	39.9	1.51	0.59
180.	18.7	2.14	1.05
181.	59.8	1.84	1.80
182.	69.6	1.86	1.54
183.	64.2	1.89	1.92
184.	49.8	1.83	1.14
185.	54.5	1.75	0.97
186.	39.4	1.61	0.79
187.	50.9	1.66	0.99
188.	59.9	1.70	0.99
189.	59.1	1.81	1.49
190.	6.9	1.44	0.33
191.	9.9	1.52	0.38
192.	15.2	1.62	0.56
193.	8.9	1.50	0.37
194.	55.1	1.29	0.74
195.	26.0	1.71	0.72
196.	35.7	1.67	0.85
197.	56.0	1.62	0.80
198.	47.7	1.81	1.52
199.	14.0	1.38	0.45
200.	27.9	1.78	1.21
201.	19.9	1.52	0.57
202.	7.6	1.32	0.30
203.	41.7	1.64	1.21
204.	67.9	1.73	1.51
205.	59.8	1.72	1.42
206.	5.9	1.14	0.22
207.	10.7	1.41	0.39
208.	8.7	1.36	0.36
209.	7.8	1.29	0.32
210.	21.6	1.65	0.71

211.	57.9	1.76	1.28
212.	31.8	1.54	0.78
213.	56.6	1.80	0.92
214.	40.0	1.72	1.03
215.	41.2	1.77	1.11
216.	47.2	1.79	1.53
217.	46.8	1.79	1.30
218.	21.3	1.71	0.75
219.	43.7	1.79	1.49
220.	45.0	1.70	1.03
221.	45.8	1.72	1.29
222.	27.6	1.71	0.78
223.	37.1	1.95	1.76
224.	5	1.52	0.55

Tabla No 24.

Comparación Promedios concentración, Relación 260/280, Relación 260/230 Extracción DNA Kit Qiagen Vs Salting out modificado

Método	Concentración ng/uL	R 260/280	R 260/230
Salting out M	93,89	1,74	2,73
Kit	35,12	1,76	1,66

Tabla No 25

Comparación KIT Vs Salting out la misma muestra (Sangre con EDTA) por triplicado.

Método	Concentración ng/uL	Relación 260/280	Relación 260/230
Muestra 1 S.O.M	22,6	2,14	3,26
Muestra 1 S.O.M	31,8	1,81	2,36
Muestra 1 S.O.M	24,6	2,52	9,62
Muestra 1 KIT Q	11,5	1,05	-
Muestra 1 KIT Q	12,6	1,10	-
Muestra 1 KIT Q	11,2	1,04	0,53

Tabla No 26.

Comparación Salting out modificado con otros Salting out de otras investigaciones de diferentes tipos de muestra

Método	Concentración ng/uL	R 260/280	R 260/230	Tipo de Muestra
Salting out M	93,89	1,74	2,73	Sangre
Eslami 2017	48,13	1,68	0,73	Larvas
Cortes 2012	19,48	1,68	-	Sangre
Rivero 2006	28,5	1,86	-	Tejido en parafina
Poh 2014	24,33	1,93	-	Sangre
Dilhari 2017	62,2	1,95	0,9	Tejido
Bettina 2000	50,22	1,53	-	Sangre

Tabla No 27 (Glasel, 1995).

Criterios de aceptación de DNA extraído

Relación	Valor	Pureza
260/280	1.8 – 2.0	ADN optimo
	1.6 – 1.8	ADN Aceptable
	< 1.6	Contaminación con compuestos aromáticos
	> 2.1	Contaminación con RNA
260/230	< 1.5	Contaminacion con sales, carbohidratos ó fenoles.

16. Figuras

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCAATGATGCCTTTGAAGTG	22	57.22	40.91	4.00	2.00
Reverse primer	CCCAACTGTCCTATCAATCA	21	57.07	47.62	3.00	1.00

Products on target templates

>[KU893127.1](#) Hepatozoon canis isolate dog 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 192
Forward primer 1 AGCAATGATGCCTTTGAAGTG 22
Template      679 ..... 700

Reverse primer 1 CCCAACTGTCCTATCAATCA 21
Template      870 ..... 850
```

>[KU893125.1](#) Hepatozoon canis isolate fox 33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 195
Forward primer 1 AGCAATGATGCCTTTGAAGTG 22
Template      689 ..... 710

Reverse primer 1 CCCAACTGTCCTATCAATCA 21
Template      883 ..... 863
```

Figura 3.

Oligo Analyzer Primers – Sonda *H. canis*

primer Forware H. canis - Primer Reverse H. canis annealing:

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 |||| :
 3'-ACTAACTATCCCTGTCAACCC-5'
 dG: -2,26 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 : |||| : : :
 3'-ACTAACTATCCCTGTCAACCC-5'
 dG: -1,79 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 |||| : :
 3'-ACTAACTATCCCTGTCAACCC-5'
 dG: -1,79 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 : : : : |||
 3'-ACTAACTATCCCTGTCAACCC-5'
 dG: -0,69 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 |||
 3'-ACTAACTATCCCTGTCAACCC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 : : |||
 3'-ACTAACTATCCCTGTCAACCC-5'
 dG: 0,27 kcal/mol

primer Forware H. canis - Sonda H. canis annealing:

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 ||| : : : : : :
 3'-TTCGCAACCGGACGATCTTTGTGAGA-5'
 dG: -1,53 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 : : : : ||| :
 3'-TTCGCAACCGGACGATCTTTGTGAGA-5'
 dG: -1,46 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 : ||| : :
 3'-TTCGCAACCGGACGATCTTTGTGAGA-5'
 dG: -0,69 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 ||| :
 3'-TTCGCAACCGGACGATCTTTGTGAGA-5'
 dG: -0,33 kcal/mol

5'-AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG-3'
 : : : |||
 3'-TTCGCAACCGGACGATCTTTGTGAGA-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

Primer Reverse H. canis - Sonda H. canis annealing:

5'-CCCAACTGTCCTTATCAATCA-3'

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGAGTTCATTCCCTGCTTCTCA	22	57.64	40.91	4.00	1.00
Reverse primer	TGGATGAGTTCCAACATTAGG	22	56.06	40.91	4.00	2.00

Products on target templates

>CP000107.1 Ehrlichia canis str. Jake, complete genome

```
product length = 143
Forward primer 1 TGAGTTCATTCCCTGCTTCTCA 22
Template 20626 ..... 20647
Reverse primer 1 TGGATGAGTTCCAACATTAGG 22
Template 20768 ..... 20747
```

>CP025749.1 Ehrlichia canis strain YZ-1 chromosome, complete genome

```
product length = 143
Forward primer 1 TGAGTTCATTCCCTGCTTCTCA 22
Template 20410 ..... 20431
Reverse primer 1 TGGATGAGTTCCAACATTAGG 22
Template 20552 ..... 20531
```

>CP007480.1 Ehrlichia chaffeensis str. West Paces, complete genome

```
product length = 143
Forward primer 1 TGAGTTCATTCCCTGCTTCTCA 22
Template 1161424 .....C... 1161403
Reverse primer 1 TGGATGAGTTCCAACATTAGG 22
Template 1161282 ..... 1161303
```

Figura 6.

Oligo Analyzer Primers – Sonda *Ehrlichia sp*

Primer Forware Ehrl - Primer Reverse Ehrlic annealing:

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : |||| :

3'-GGATTACAACCTTTGAGTAGGT-5'
 dG: -1,79 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 ||| : : :

3'-GGATTACAACCTTTGAGTAGGT-5'
 dG: -1,46 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : : |||

3'-GGATTACAACCTTTGAGTAGGT-5'
 dG: -1,43 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : : : |||

3'-GGATTACAACCTTTGAGTAGGT-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 ||| : : :

3'-GGATTACAACCTTTGAGTAGGT-5'
 dG: -0,07 kcal/mol

Primer Forware Ehrl - Sonda Ehrl annealing:

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : : ||||

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -3,38 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 ||| : : :

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 |||

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : ||| :

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : : : |||

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : : : |||

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

5'-TGAGTTCATTCTGCTTCTTCA-3'
 : ||| : : :

3'-AGTTTGTCCATAGCGTATAAAGGCACC-5'
 dG: -0,22 kcal/mol

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGGCTGAGAACGGGAAACT	20	59.23	50.00	3.00	1.00
Reverse primer	TACTCAGCACCAGCATCACC	20	59.75	55.00	3.00	0.00

Products on target templates

>[KX942040.1](#) Crocuta crocuta isolate PvH2-C glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, partial cds

```
product length = 101
Forward primer 1  AAGGCTGAGAACGGGAAACT  20
Template       52  ..... 71
Reverse primer 1  TACTCAGCACCAGCATCACC  20
Template      152  ..... 133
```

>[XM_003435649.4](#) PREDICTED: Canis lupus familiaris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC100688969), mRNA

```
product length = 101
Forward primer 1  AAGGCTGAGAACGGGAAACT  20
Template      244  ..... 263
Reverse primer 1  TACTCAGCACCAGCATCACC  20
Template      344  ..... 325
```

>[XM_014109964.2](#) PREDICTED: Canis lupus familiaris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC106558132), mRNA

```
product length = 101
Forward primer 1  AAGGCTGAGAACGGGAAACT  20
Template      286  ..... 305
Reverse primer 1  TACTCAGCACCAGCATCACC  20
Template      386  ..... 367
```

Figura 9.

Oligo Analyzer Primers – Sonda control interno Gadph

primer Forware Gadph - primer reverser Gadph annealing:

5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3'
 ||||| :
 3'-CCACTACGACCACGACTCAT-5'
 dG: -6,66 kcal/mol

5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3'
 : |||| : : :
 3'-CCACTACGACCACGACTCAT-5'
 dG: -3,48 kcal/mol

5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3'
 : ||| : :
 3'-CCACTACGACCACGACTCAT-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

primer Forware Gadph - Sonda Gadph annealing:

5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3'
 : : : |||||
 3'-GTAAACTACAACCGCCCTAGAGC-5'
 dG: -8,12 kcal/mol

5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3'
 ||| : :
 3'-GTAAACTACAACCGCCCTAGAGC-5'
 dG: -3,00 kcal/mol

5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3'
 ||| : : :
 3'-GTAAACTACAACCGCCCTAGAGC-5'
 dG: -0,31 kcal/mol

primer reverser Gadph - Sonda Gadph annealing:

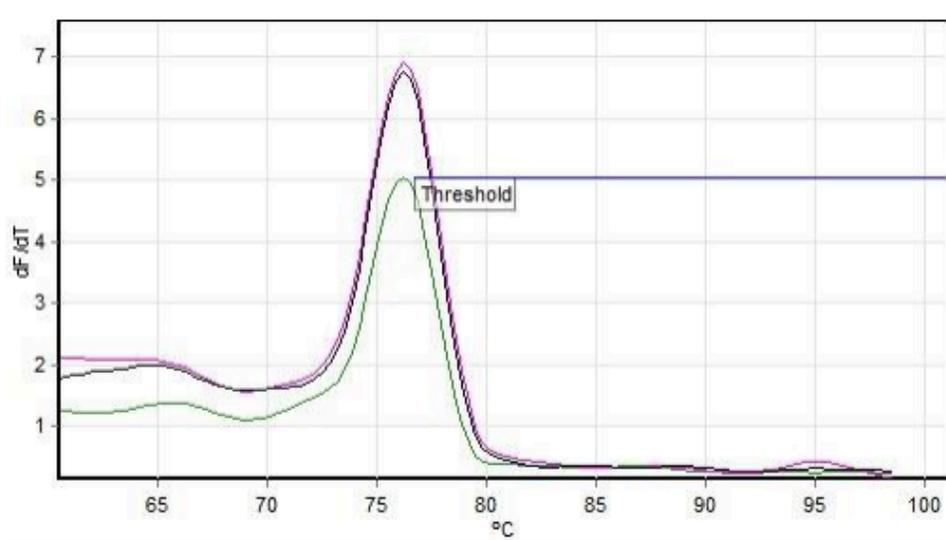
5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3'
 |||
 3'-GTAAACTACAACCGCCCTAGAGC-5'
 dG: -0,22 kcal/mol

5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3'
 |||
 3'-GTAAACTACAACCGCCCTAGAGC-5'
 dG: 0,04 kcal/mol

5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3'
 : : : ||| :
 3'-GTAAACTACAACCGCCCTAGAGC-5'
 dG: 0,16 kcal/mol

Figura 14.

Reportes de la PCR *Ehrlichia sp* con el protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen con curva melting



No.	Color	Name	Genotype	Peak 1
9	Green	Cp E-H		
10	Purple	Cp E-H		
11	Black	Cp E-H		

Bin Name	Temperature	Sample No.	Sample Name	Peak

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)
Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

Figura 15.

Comparación tm Curva melting *Ehrlichia sp*, Tm de 77°C con uMelt

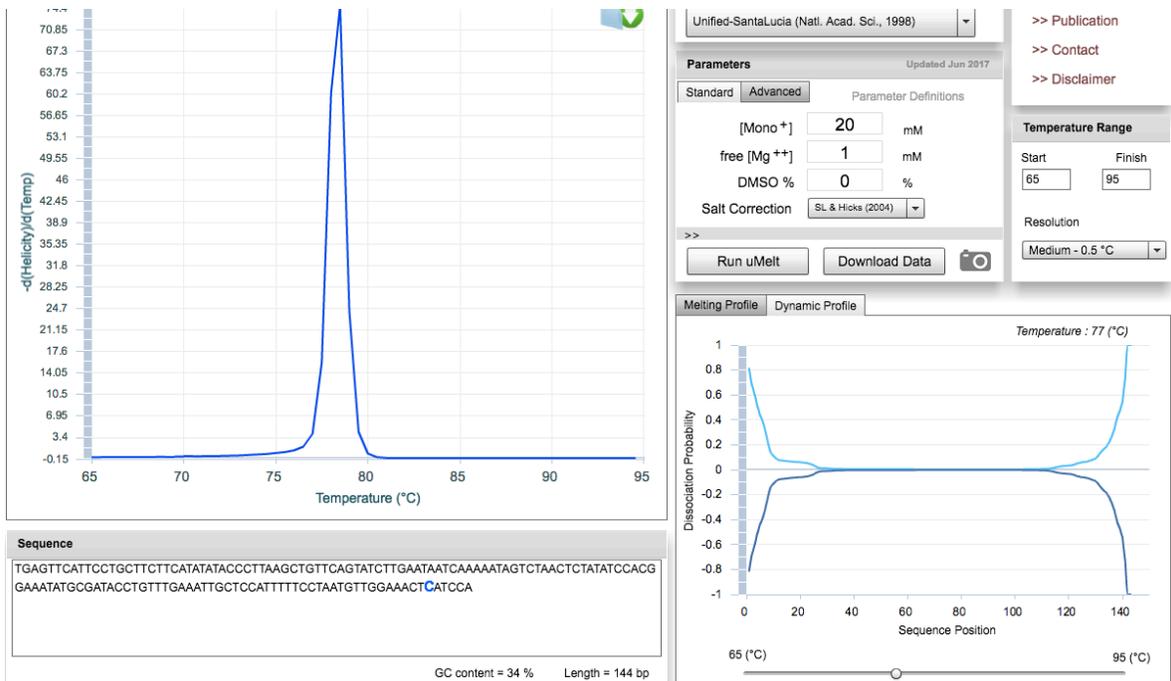
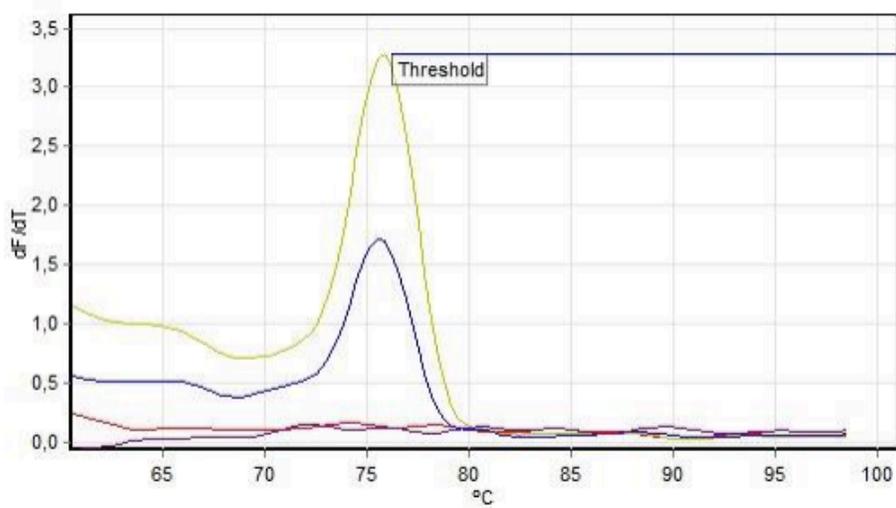


Figura 16.

Reportes de la PCR *H. canis* con el protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen más curva Melting



No.	Color	Name	Genotype	Peak 1
1	Red	Cp 205 Hep		
2	Yellow	Cp 252 Hep		
3	Blue	Cp HB		
4	Purple	Control Negativo Hep		

Bin Name	Temperature	Sample No.	Sample Name	Peak

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)
 Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

Figura 17.

Comparación tm Curva melting *H. canis*, Tm de 76°C con uMelt

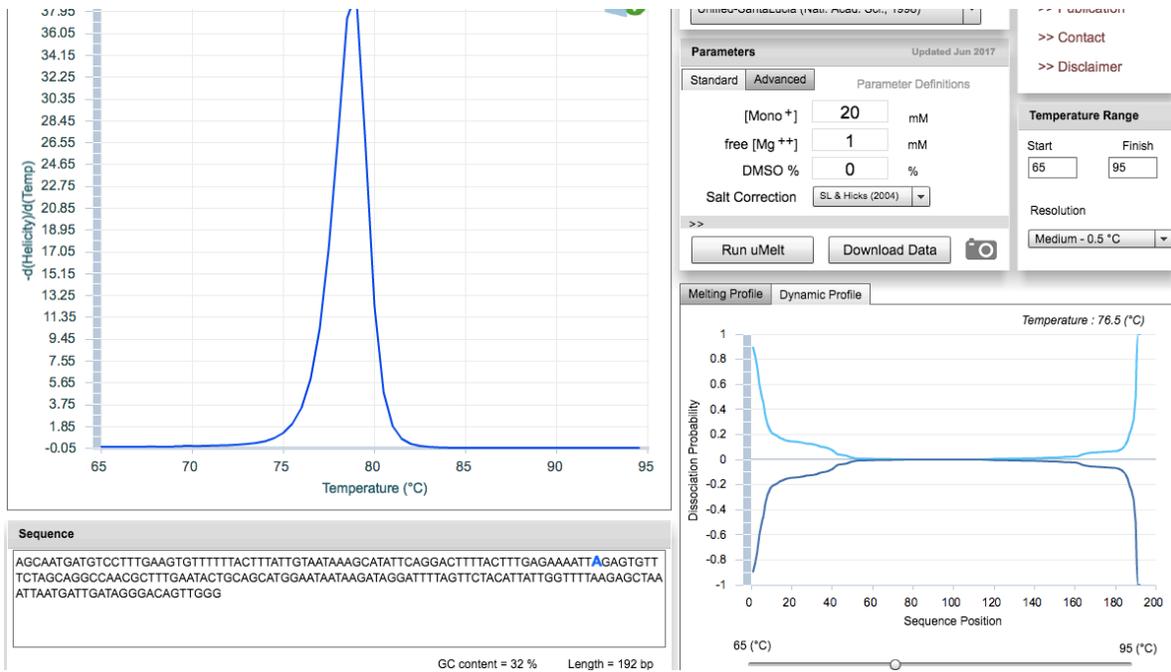


Figura 18.

Reportes de la PCR *H. canis* con el protocolo Quantinova Syber Green de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen más curva Melting

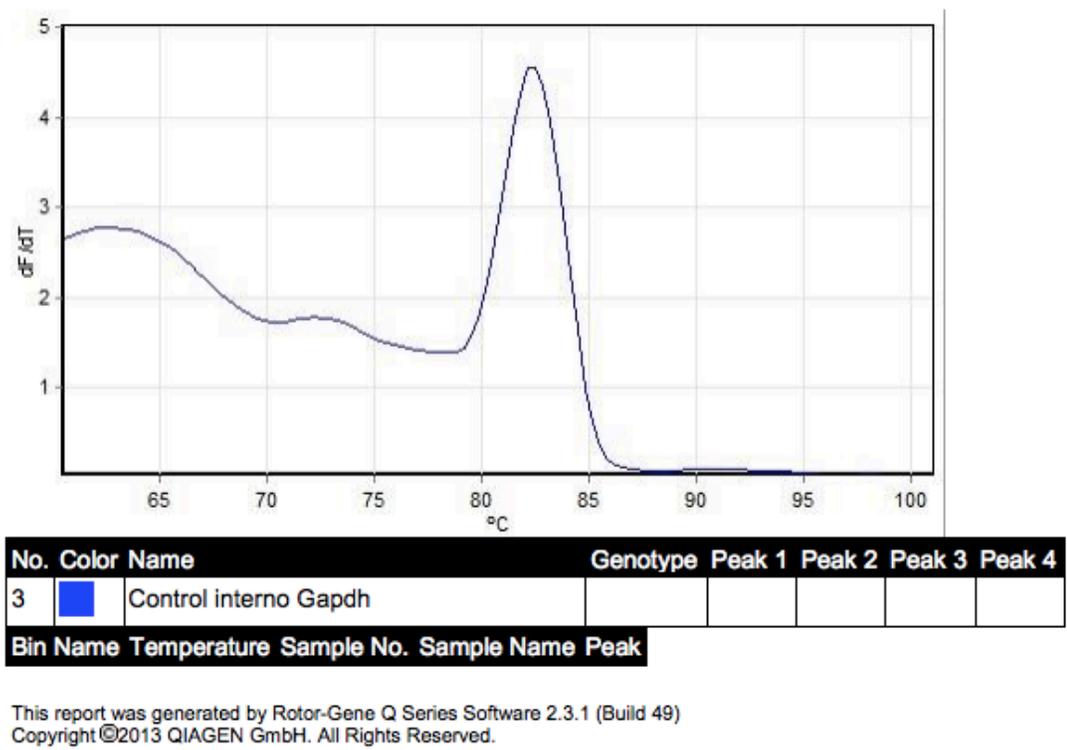


Figura 19.

Comparación tm Curva melting control interno Gadph, Tm de 84°C con uMelt

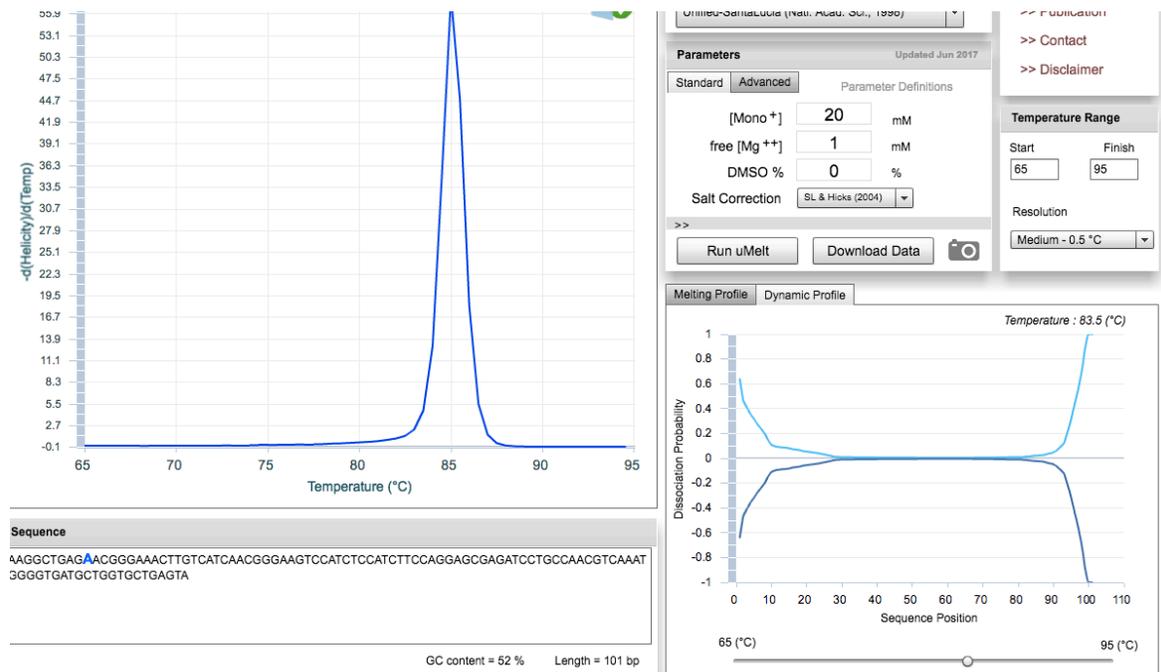
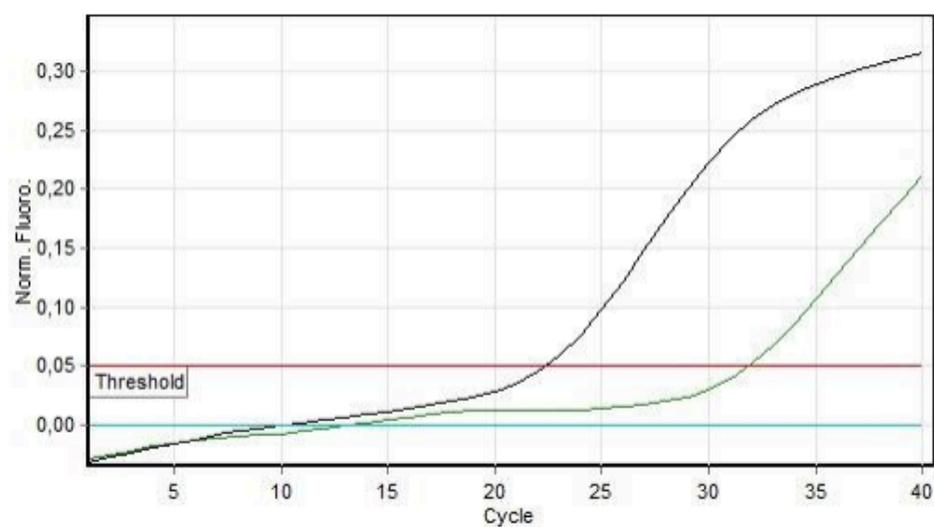


Figura 20.

Reportes de la PCR *H. canis* con el protocolo Quantinova probe de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen.



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)
7	■	42312 hep bab dogtorcatb sofi TR	Unknown		NEG (NTC)	
8	■	41024 hep bab mascovet bella PF	Unknown		NEG (NTC)	
9	■	43009 hep bab animalcenter thor PF	Unknown		POSITIVO	
10	■	43281 hep bab zooanaliz teo PF	Unknown		NEG (NTC)	
11	■	Control Positivo Hepatozoon Babesia	Positive Control	22,47	POSITIVO	
12	■	Control Negativo Hepatozoon Babesia	NTC		NEG (NTC)	

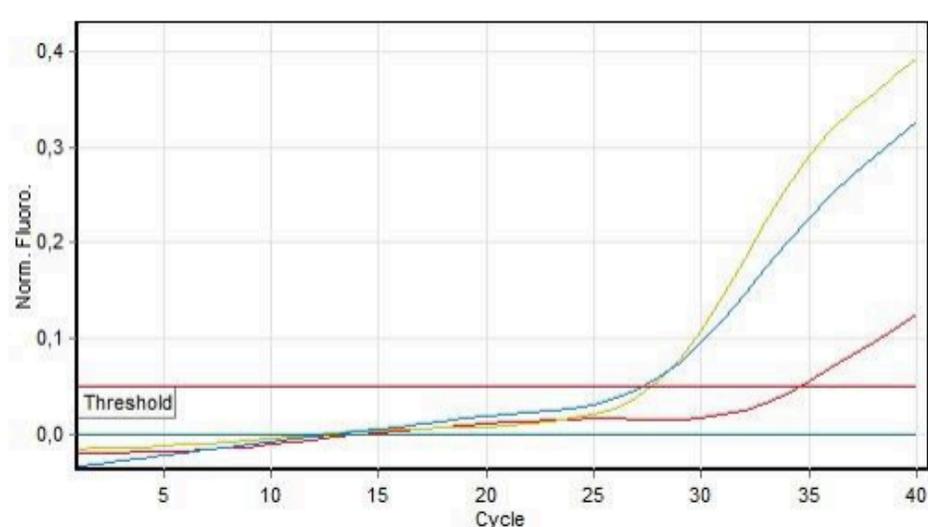
Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Figura 21.

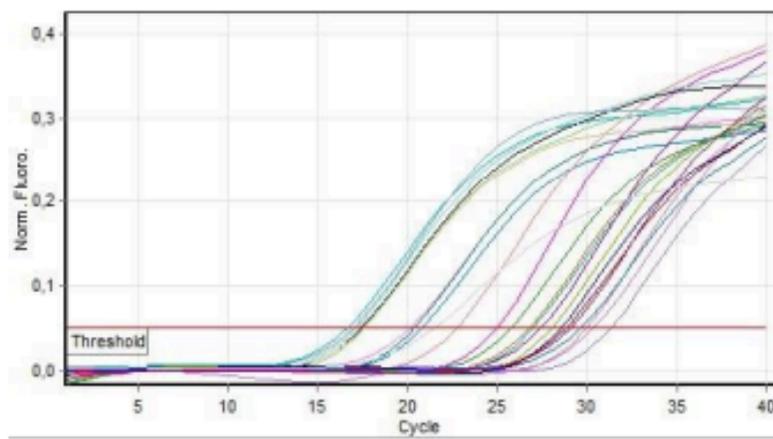
Reportes de la PCR *Ehrlichia sp* con el protocolo Quantinova probe de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen.



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)
1	Red	42309 ana ehrl dogtorcatb cristiano TR	Unknown	34,63	POSITIVO	
2	Yellow	44205 ana ehrl sanlucamed azlam TR	Unknown	27,77	POSITIVO	
3	Blue	43554 ana ehrl dracatherinm juanita PF	Unknown		NEG (NTC)	
4	Purple	43497 ana ehrl hospitalvetudea sofia PF	Unknown		NEG (NTC)	
5	Pink	44199 ana ehrl dracatastm bongo PF	Unknown		NEG (NTC)	
6	Blue	Control Positivo Anaplasma Ehrlichia	Positive Control	27,33	POSITIVO	
7	Teal	Control Negativo Anaplasma Ehrlichia	NTC		NEG (NTC)	

Figura 22.

Reportes de la PCR *Control interno Gadph* con el protocolo Quantinova probe de Qiagen en el termociclador Rotor Gene Q 2 Plex + HRM de Qiagen.



No	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)
5	Light Blue	gadph k #1	Positive Control	20,15	POSITIVO		
6	Light Green	gadph k #2	Positive Control	20,81	POSITIVO		
7	Light Red	gadph k #3	Positive Control	20,34	POSITIVO		
8	Light Purple	gadph 0,5 #1	Positive Control	22,74	POSITIVO		
9	Light Orange	gadph 0,5 #2	Positive Control	25,74	POSITIVO		
10	Light Yellow	gadph 0,5 #3	Positive Control	24,97	POSITIVO		
11	Light Cyan	gadph 200 #1	Positive Control	17,45	POSITIVO		
12	Light Blue-Gray	gadph 200 #2	Positive Control	16,67	POSITIVO		
13	Light Green-Gray	gadph 200 #3	Positive Control	17,52	POSITIVO		
14	Light Red-Gray	gadph 500 #1	Positive Control	17,57	POSITIVO		
15	Light Purple-Gray	gadph 500 #2	Positive Control	17,10	POSITIVO		
16	Light Orange-Gray	gadph 500 #3	Positive Control	16,98	POSITIVO		
17	Light Yellow-Gray	gadph 1 #1	Positive Control	31,32	POSITIVO		
18	Light Cyan-Gray	gadph 1 #2	Positive Control	30,34	POSITIVO		
19	Light Blue-Gray	gadph 1 #3	Positive Control	29,99	POSITIVO		
20	Light Green-Gray	gadph 5 #1	Positive Control	28,80	POSITIVO		

No	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)
21	■	gadph 5 #2	Positive Control	26,79	POSITIVO		
22	■	gadph 5 #3	Positive Control	28,02	POSITIVO		
23	■	gadph 10 #1	Positive Control	26,99	POSITIVO		
24	■	gadph 10 #2	Positive Control	29,66	POSITIVO		
25	■	gadph 10 #3	Positive Control	28,51	POSITIVO		
26	■	gadph 817 #2	Positive Control	27,41	POSITIVO		
27	■	gadph 817 #3	Positive Control	29,07	POSITIVO		
28	■	gadph 839	Positive Control	21,46	POSITIVO		

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)
Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

Figura 23.

Secuenciación *Ehrlichia* sp

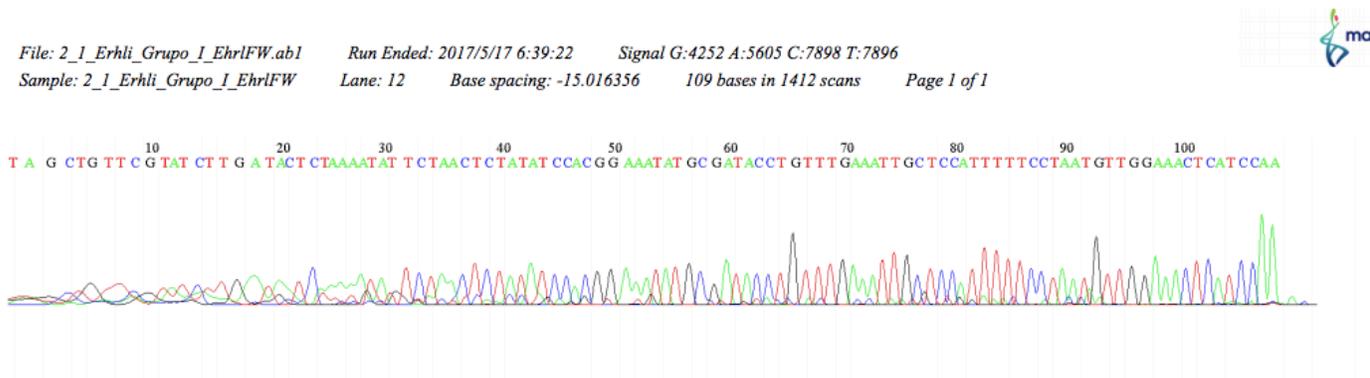


Figura 24.

Blast de la Secuenciación *Ehlichia* sp

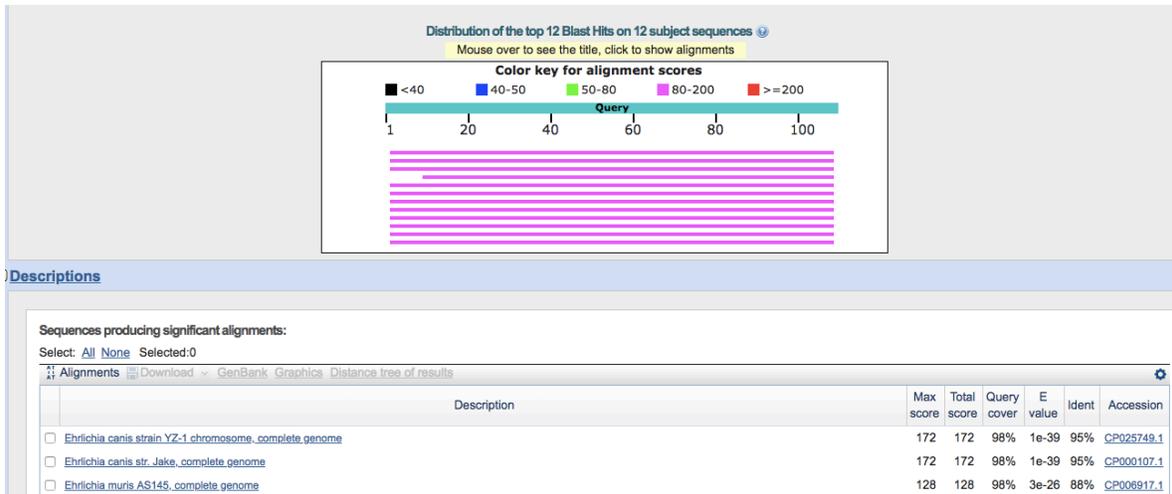


Figura 25.

Secuenciación *H. canis*

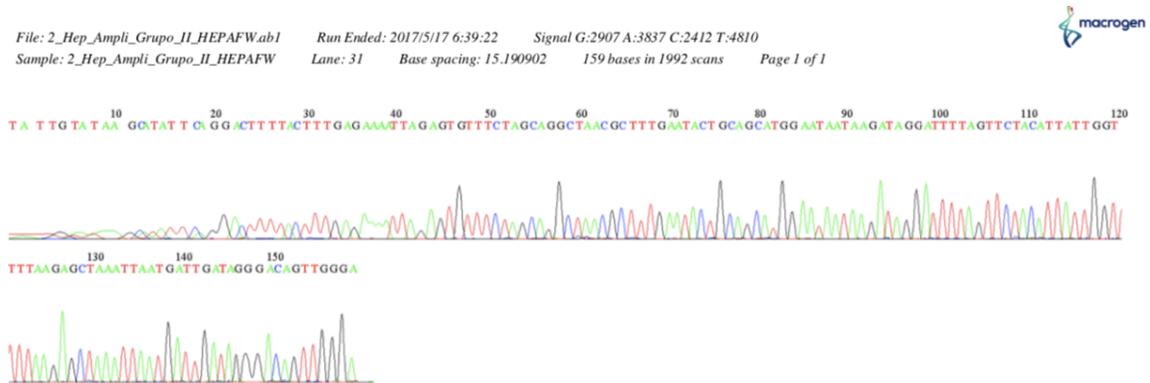


Figura 26.

Blast secuenciación *H. canis*

Job title: Nucleotide Sequence (159 letters)

RID [DM4T9YZA015](#) (Expires on 04-22 00:19 am)
 Query ID [lcl|Query_121525](#)
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 159

Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nt)
 Program BLASTN 2.8.0+ > [Citation](#)

Other reports: > [Search Summary](#) [[Taxonomy reports](#)] [[Distance tree of results](#)] [[MSA viewer](#)]

Graphic Summary



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate IHF2 long small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	MG758124.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	MG062866.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 3474 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX712129.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 2734 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX712127.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 2480 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX712125.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 89 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX880506.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 71 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX880504.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 58 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX880503.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KX880502.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate tick5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KY433326.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate dog4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KY433319.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 90 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KJ821659.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 80 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KJ821657.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KT736298.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon canis isolate 116 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KJ868819.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon sp. JPM-2014 isolate 1516FC7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KJ499495.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon sp. JPM-2014 isolate 6589A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KJ499492.1
<input type="checkbox"/> Hepatozoon sp. JPM-2014 isolate 4439B9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	283	283	99%	9e-73	99%	KJ499491.1

Figura 27.

Secuenciación Control interno Gadh

File: 8-Gadh_9-GADPf.ab1 Run Ended: 2018/5/15 20:3:29 Signal G:3662 A:4607 C:5314 T:5442
 Sample: 8-Gadh_9-GADPf Lane: 21 Base spacing: -13.4993105 72 bases in 940 scans Page 1 of 1

ACGGG CAGTCA TCTCAT CTTCA GAGCGAG ATCCC GCCAACATCAAATGGGGTG ATGCTGGTGCTGAGTAA

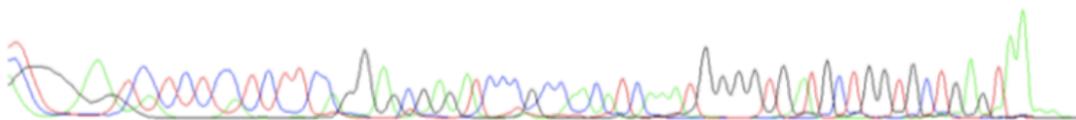
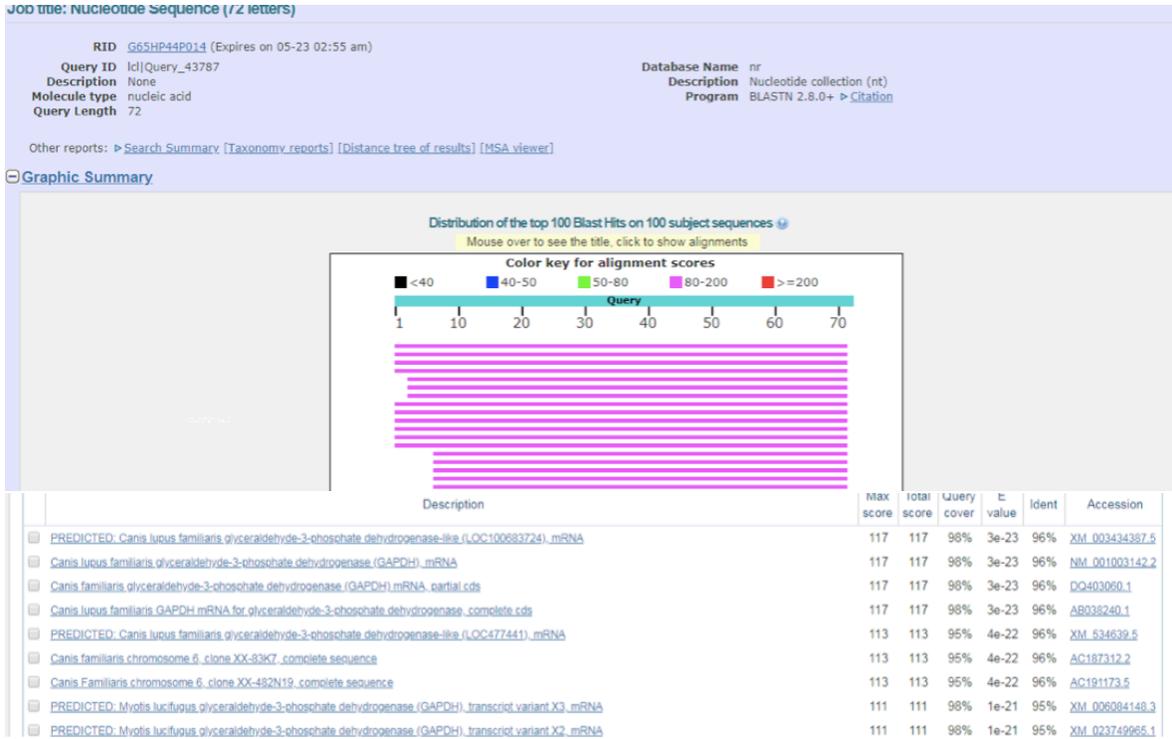


Figura 28.

Blast Secuenciación control interno Gadph



16 Bibliografía

Abarca, K, López, J, Perret, C, Guerrero, J, Godoy, P., Veloz, A., Valiente-Echeverría F, León U, Gutjahr, C, Azócar, T. 2007. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (9), 1392–1395.

Abeygunawardena I, Kakoma I. 1990. Pathophysiology of canine ehrlichiosis. *Ehrlichiosis*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: pp. 79-92.

Aguirre E, Ayllón T. 2008. Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*. In Press.

Aguirre E, Sainz S, Dunner I, Amusatogui L, López F, Rodríguez-Franco I, Luaces O, Cortés and Tesouro M. 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet. Parasitol.* 125:365-372.

Alonso M. 2017. PCR en tiempo real para la detección simultánea de rotavirus y adenovirus humano a partir de diferentes matrices. Tesis Universidad ORT Uruguay.

Alvarez J, Sota M, Vivanco A, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, & Garaizar J. 2004. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1734–1738. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1734-1738>.

Alvarez M, Pérez E. 2004. La PCR multiple en microbiología clínica. *Enferm infec microbial clin.* 22(3):183-92.

Alves M, Linhares, C, Chaves, S, Monteiro C, Linhares D. 2005. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR, *Ciência animal brasileira*, Ene./Marz.,2005. v.6, no 1, Pp. 49-54.

Anderson E, Greene E. 1992. *Ehrlichia ewingii* sp. Nov the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *Int J Syst Bacteriol* 42(2): 299-302.

Ardila M, Cala A, Vargas H, Arcila H, Castellanos V. 2007. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 1695–7504, 8(5): (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/ n050507.html>).

Arguin M, Singleton J. 1999. An investigation into the possibility of transmission of tick-borne pathogens via blood transfusion. *Transfusion-Associated Tick-Borne Illness Task Force. Transfusion* 39(8): 828-33.

Assal F, Alarcón M, Solomon C, Masterman D, Geschwind H, Cummings L. 2004. Association of the Serotonin Transporter and Receptor Gene Polymorphisms in Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer Disease. *Arch Neurol*;61(8):1249–1253. doi:10.1001/archneur.61.8.1249.

Baneth G, Barta J, Shkap V, Martin D, Macintire D, Jhonson N. 2000. Genetic and Antigenic Evidence Supports the Separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* vol. 38 no. 3 1298-1301.

Baneth G, Weigler B: 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med*, 11: 365-376.

Baneth V. Shkap Z, Pipano E. 1996. *Hepatozoon canis*: Prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 6, No. 2, 35 *Veterinary Research Communications*, 20, 41-46.

Baneth, G. 2006. Hepatozoonosis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed., C. E. Greene (ed.) W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 698-705.

Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. 2001. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Parasitol.* 87, 606–611.

Bartsch R, Greene T. 1996. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *J Vet Intern Med* 10(4): 271-4.

Bellah R, Shull M. 1986. *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 189(8): 922-3.

Benavides J, Ramirez, F, 2003. Ehrlichiosis canina. *Rev. Colombiana Ciencias Pecuárias* 16, 268–273.

Bettina B, Horacio L, Aguirre M, gorodner J. 2000. Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Univerdad nacional del nordeste.

Bool P, Suttmoller, P 1957. *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles). *J Am Vet Med Assoc* 130(9): 418-20.

Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba- Carretero, J.C., Florin-Christensen, M., 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147, 16–25.

Boschiroli M, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevielle C, Lavigne J, Liautard J, Ramuz M, O'Callaghan D. 2002. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.* 90:341-348.

Botros A, Elmolla M. 1995. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort J Vet Res 62(1): 41-3.

Branger J, Rolain M, Raoult D. 2004. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real – time PCR. Antimicrob Agents Chemother. Dec: 48 (12):4822-8.

Breithschwerdt B. 1995. "The rickettsiosis." En: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, W. B. Saunders: pp. 376-383

Breitschwerdt E, Hegarty B, Hancock S. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J. Clin. Microbiol. 36, 2645–2651.

Buhles W, Huxsoll D, Ristic M. 1974. Tropical Canine Pancytopenia: Clinical, Hematologic, and Serologic Response of Dogs to *Ehrlichia canis* Infection, Tetracycline Therapy, and Challenge Inoculation. *The Journal of Infectious Diseases*, 130(4), 357-367. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/30106143>.

Bustin S, Beaulieu J, Huggett J, Jaggi R, Kibenge F, Olsvik P, Toegel S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11, 74.

Castro M, Machado R, Aquino L, Alessi A, Costa M. 2004. Experimental acute canine monocytic Ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119, 73–86.

Castro, L., Azevedo, M., O'Dwyer. (2013). Hepatozoonose canina no Brasil: aspectos da biología e transmissão. *Veterinária e Zootecnia*, 2, 193-202. Recuperado de revistas.bvs-vet.org.br/rvz/article/download/22952/23806

Codner C, Farris-Smith L. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 189(1): 47-50.

Codner C, Maslin W. 1992. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am J Vet Res* 53(3): 294-9

Codner C, Roberts E. 1985. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 186(2): 166-9.

Codner C, Roberts R. 1985. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 186(2): 166-9.

Cohn, A. 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33(4): 863-84.

Collins B, Moore C 1991. Canine anterior uvea. *Veterinary Ophthalmology*. K. N. Gelatt. Philadelphia, Lea and Febiger: pp. 357-95.

Contreras S, Sanabria E. 2006. Determinación de pacientes positivos a *Ehrlichia canis* mediante prueba de inmunofluorescencia, comparada con diagnóstico clínico, lectura de extendido sanguíneo y cuadro hemático con recuento de plaquetas. Trabajo de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, 57 p.

Cortes D, Haupt L, Lea R, Griffiths L. 2012. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. Volume 39, issue 5, pp 5961 – 5966.

Cowell L, Tyler D. 1988. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192(8): 1093-5.

Craig M, Smallwood E, Knauer K, Mcgrath P. 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematologic findings, *J Am Vet Med Assoc*, Oct. v. 173, no 8, Pp. 967-972.

Craig M. 1990. *Hepatozoonosis: Infectious diseases of the dog and cat*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 778- 785.

Criado-Fornelio A, Rey-Valeiron C, Buling A, Barba-Carretero JC, Jefferies R, Irwin P. 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet Parasitol* 144(3-4):261-269.

Cummings J, Panciera J, Kocan M, Matew S, Ewings A. 2005. Characterization of stages of *Hepatozoon americanum* and of parasitized canine host cell, *Vet Pathol*. v. 42, Pp. 788-79

Dagnone A, De Moraes H, Vidotto M, Jojima F, Vidotto O. 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet Parasitol*. 117, 285-290.

Dagnone A, Souza A, André M, Machado R. 2009. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18 (4), 20-25

Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol*, 152:173-185.

Davoust B, Parzy D. 1991. Ehrlichiosis canine expérimentale. Étude clinique et thérapeutique. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 167: 33-40.

Dawson E, Rikihisa Y. 1991. Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *J Infect Dis* 163(3): 564-7

Dilhari A, Sampath A, Gunasekara C, Fernando N, Weerasekara D, Sissons C, Weerasekera, M. 2017. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. *AMB Express*, 7, 179. <http://doi.org/10.1186/s13568-017-0477-z>

Donatien A. 1935. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bull Soc Pathol Exot*, 28:418-419.

Eddlestone M, Diniz P. 2007. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J Vet Intern Med* 21(6): 1237-42.

Egenvall A, Bjoersdorff A. 1998. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Vet Rec* 143(15): 412-7.

Eiras D, Basabe J, Scodellaro C, Banach D, Matos M, Krimer A, Baneth G. 2007. First molecular characterization of canine hepato- zoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. *Vet Parasitol* 149(3–4):275–279.

Elias E, Homans P. 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings; treatment. *J Small Anim Pract* 29: 55-62.

Elias E. 1991. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *J Small Anim Pract* 33: 540-543.

Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, Klapper P. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*; 13:559-70.

Eslami G, Khalatbari-Limaki S, Ehrampoush M, Gholamrezaei M, Hajimohammadi B, & Oryan A. 2017. Comparison of Three Different DNA Extraction Methods for *Linguatula serrata* as a Food Born Pathogen. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(2), 236–242.

Ewing, S. 1969. Canine ehrlichiosis. *Adv Vet Sci Comp Med*. 13:331-353.

Ezekoli C, Ogunkoya A, Abdullahi R, Tekedec L, Sannusi A, Ilemobade A. 1983. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. *J. Small Anim. Pract.* 24, 455–460.

Fernández A, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González- Juanatey J, Regueiro B. 2010. Evaluación de una PCR multiplex en tiempo real para la detección de patógenos en el tejido valvular de pacientes con endocarditis. *Rev Esp Cardiol*; 63:1205-8.

Frank J, Breitschwerdt E. 1999. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 13(3): 194-201.

Garmendia G, Vero S. 2011. Puesta a punto del método de PCR en tiempo real para la cuantificación de *Aspergillus carbonarius* en uvas *Vitis vinifera* cv. Tannat No. 6 - 2011 - INNOTECH - 47

Gelatt N. 1991. Canine anterior uvea. In: *Veterinary Ophthalmology*. K. N. Gelatt. Philadelphia, Lea and Febiger: pp. 374-5.

Gevrey J. 1993. Hepatozoonose canine. *Recueil de Medecine Veterinaire*. 169, 5/6, 451- 455.

Glasel J. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques*; 18:62-3.

Gomez F. 2002. Comparación de las técnicas IFAT y frotis sanguíneo para el diagnóstico de ehrlichiosis canina. Trabajo de graduación – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, 129 p.

Greene E, Burgdorfer W. 1985. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 186(5): 465-72.

Greene, C. Harvey J. 1984. Canine ehrlichiosis. En: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C. E. Greene. Philadelphia, W. B. Saunders: pp. 704-9.

Groves G, Dennis G. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 36(7): 937-40.

Guillén J, López M. 2002. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 109(3-4): 185-90

Harmelin P, Dubey B, Yakobson A, Nyska U, Orgad. 1992. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. *Veterinary Parasitology*, 43, 131-136.

Harrus S, Alleman A. 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol* 86(4): 361-8.

Harrus S, Aroch I. 1997. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec* 141(10): 247-50.

Harrus S, Bark H. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *Comp Cont Educ Pract Vet* 19: 431-43.

Harrus S, Ofri R. 1998. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol* 78(2): 155-60

- Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AWCA. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol*; 37:2745-2749.
- Harrus S, Waner T. 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 66(3-4): 241-9.
- Harrus S, Waner T. 1996. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Rec* 139(12): 290-3.
- Harrus S, Waner T. 1998. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol* 36(7): 2140-2.
- Harrus S, Waner T. 1998. Amplification of *Ehrlichia* DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 36(1): 73-6
- Harrus S, Waner T. 1998. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 62(1): 15-27
- Harrus S, Waner T. 1996. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 51(1-2): 13-20.
- Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen A. 1999. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2745–2749.
- Harrus S, Kass P. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec* 141(14): 360-3.
- Heeb H, Wilkerson J. 2003. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 39(4): 379-84.
- Hegarty B, Levy M. 1997. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. *J Vet Diagn Invest* 9(1): 32-8.
- Hernandez G, Marcos R, Thiago D, Joice M. L, Rosangela Z, Costa, M. 2011. Molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from Colombia. *Parasitol Res* 110:489–492
- Hervas L, Carrasco C, Gomez A, Mendez M, Sierra. 1995. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histopathological and ultrastructural study. *Veterinary record*, 137, 518-519.
- Hibler C, Hoskins, J, Greene E. (1986). Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Comp Cont Educ Pract Vet* 8: 106-114.

Hidalgo M, Vesga F, Lizarazo D, Valbuena G. 2009. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chaffeensis* domestic animals from a rural area of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 1029–1030.

Hori-Oshima S, Tinoco S, Barreras M, Moro and J. Viñasco. 2006. Detección de *Ehrlichia canis* mediante ELISA y PCR en perros de Mexicali, Baja California. En: VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Set. 28 -30. Asociación Mexicana de Parasitólogos Veterinarios, A.C., México.

Huxsoll L, Amyx H I. 1972. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. *Exp Parasitol* 31(1): 53-9

Inokuma H, Okuda K, Ohno K, Shimoda, Onishi T. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*, 106, 265-271.

Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Vet. Parasitol.* 106, 265–271.

Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 32(7): 1658-62.

Ivanov A, Tsachev I. 2008. Hepatozoon canis and Hepatozoonosis in the dog. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 6, No. 2, pp27-35,
J. Clin. Microbiol. March 2000vol. 38 no. 3 1298-1301

Kakoma I, Carson C. 1978. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infect Immun* 20(1): 242-7.

Kakoma I, Sainz A. 2000. Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis. Towards a universal case definition. *Ann N Y Acad Sci* 916: 396-403.

Keefe T, Holland C, & Salyer P. 1982. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *JAVMA*. 181:236-238.

Keysary A, Waner T. 1996. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet Parasitol* 62(3-4): 331-40.

Klag A, Dunbar E. 1991. Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog. *Can Vet J* 32(5): 305-307.

Kocan A, Crowder Levesque L, Whitworth G, Murphy S, Ewing R, Barker. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* 6:477-480.

Kuehn F, Gaunt S. 1985. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 186(4): 355-8

La Scola, B, Raoult D. 1999. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5- year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* 37(6): 1899-905.

Leiva M, Lloret. 2005. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet Ophthalmol* 8(1): 71-5.

Little S, Allen K, Johnson E, Panciera R, Reichard M, & Ewing S. 2009. New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. *Parasites & Vectors*, 2 (Suppl 1), S5. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S5>

Lockhart J, Davidson D, Stallknecht, J. Dawson J, Howerth E. 1997. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. *J. Clin. Microbiol.* 35:1681-1686.

López J, Rivera M. 2003. Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serológica. *rev. Med.*

Maretzki C, Fisher D. 1994. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 205(11): 1554-6

Matthewman L, Kelly P. 1993. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe. *J S Afr Vet Assoc* 64(3): 111- 5.

Maurya R, Kumar B, Sundar S. 2013. Evaluation of salt-out method for the isolation of DNA from whole blood a pathological approach of DNA based diagnosis. Vol 2, No 2.

McCully R, Basson P, Bigalke R, de Vos V, Young E, 1975. Observation on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 42, 117–133.

Meinkoth H, Ewing A. 1998. Morphologic and molecular evidence of a dual species *Ehrlichia* infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. *J Vet Intern Med* 12(5): 389-93

Meinkoth H, Hoover P. 1989. Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. *J Am Vet Med Assoc* 195(12): 1754-5.

Meneses, A. 1995. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *Vet. Rec.* 137:46-47.

Mercer H, Craig M. 1988. Comparison of various staining procedures in the identification of *Hepatozoon canis* gamonts, *Vet Clin Pathol*, v. 17, no 3, Pp. 63- 65.

- Messick B, Rikihisa Y. 1993. Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization, and proliferation in host cells by flow cytometry. *Infect Immun* 61(9): 3803-10.
- Moraes-Filho J, Krawczak F, Costa F, Soares J, Labruna M. 2015. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *PLoS ONE*, 10(9), e0139386.
- Murata M, Inoue S, Tateyama, Taura Y, Nakama S. 1993. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55, 867-868.
- Murata T, Shimoda K, Inoue M, Shiramizu K, Kanoe M, Taura Y, Nakama S. 1993. Seasonal periodical appearance of *Hepatozoon canis* gamonts in the peripheral blood. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 877-879.
- Murphy G, Ewing S, Whitworth L, Fox J, Kocan A. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79:325-339.
- Mylonakis E, Koutinas A. 2004. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 40(3): 174-84.
- Nakaghi A, Machado R, Costa M, André M, Baldani C. 2008. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects, *Ciencia Rural*, Santa Maria, v.38, n.3, p.766-770.
- Ndip L, Ndip N, Esemu S, DickmuV, Fokam E, Walker D, McBride J. 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* 111:59-66.
- Neer M. 1998. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: *Infectious Diseases of the dog and the cat*. 2nd edition. C. E. Greene. Philadelphia, WB Saunders Co: pp. 139-49.
- Neer T, Breitschwerdt M. 2002. Consensus statement on Ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *American College of Veterinary Internal Medicine. J Vet Intern Med* 16(3): 309-15.
- Neer T, Eddlestone M. 1999. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *J Vet Intern Med* 13(5): 501-4.
- Neer T, Harrus S. 2006. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C. E. Greene (ed.). Canada, Saunders Elsevier: 203-32.

Neer T. 1998. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: Infectious Diseases of the dog and the cat. 2nd edition. C. E. Greene. Philadelphia, WB Saunders Co: pp. 139-49.

Neer, M. 1998. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: Infectious Diseases of the dog and the cat. 2nd edition. C. E. Greene. Philadelphia, WB Saunders Co: pp. 139-49.

Nyindo B, Ristic M. 1971. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent *Ehrlichia canis*." Am J Vet Res 32(11): 1651-8.

O'Dwyer L, Massard C, Pereira de Souza J. 2001. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. Vet. Parasitol. 94, 143–150.

O'Connor T, Hanscom J. 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. Am J Vet Res 67: 206-10

Ohashi N, Unver A. 1998. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30- kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. J Clin Microbiol 36(9): 2671-80

Olano J, Masters E, Hogrefe W, Walker D. 2003. Human Monocytotropic Ehrlichiosis, Missouri. *Emerging Infectious Diseases*, 9(12), 1579–1586. <http://doi.org/10.3201/eid0912.020733>

Olano J, Wen G, Feng H, McBride J, Walker D. 2004. Histologic, Serologic, and Molecular Analysis of Persistent Ehrlichiosis in a Murine Model. *The American Journal of Pathology*, 165(3), 997–1006.

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

Oyamada M, Davoust B, el Boni M, Dereure J, Bucheton B, Hammad A, Itamoto K, Okuda K, Inokuma H. 2005. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Nov. 2005, p. 1343–1346 Vol. 12, No. 11

Paludor, Friedmann H, Dell'porto A, Macintire K, Whitley M, Boudreaux K, Baneth G, Blagburn L, Dykstra, C. 2005. *Hepatozoon spp*: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs, *Parasitology Research*, Sep., 2005. v. 97, no 2, Pp. 167-170.

Parrado M, Vargas C. 2002. Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneo en caninos con sintomatología compatible de Ehrlichiosis. Trabajo de graduación – Facultad de Ciências Agropecuárias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, 82 p.

Parzy B, Davoust, J. 1991. Human pathogenicity of *Ehrlichia canis*. Lancet 337(8750): 1169.

Pérez M, Rikihisa Y, Wen B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol; 34:2133-2139.

Pérez M, Bodor C, Zhang Q, Xiong Y, Rikihisa Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. Ann. NY. Acad. Sci. 1078: 110-117.

Pérez M, Rikihisa Y, and B. Wen. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J. Clin. Microbiol. 34:2133-2139.

Perille L, Matus R. 1991. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. J Vet Intern Med 5(3): 195-8

Pierce R, Marrs G. 1977. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. Am J Vet Res 38(11): 1821-5.

Poh, J.-J., & Gan, S. K.-E. 2014. Comparison of customized spin-column and salt-precipitation finger-prick blood DNA extraction. *Bioscience Reports*, 34(5), e00145. <http://doi.org/10.1042/BSR20140105>

Rajamanickam E, Weisenhutter D, Zin, Hamid J. 1985. The incidence of canine hematozoa in peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology*, 17, 151-157.

Rajamanickam C, Wiesenhutter E, Zin F, Hamid J. 1985. The incidence of canine hematozoa in peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 17, 151–157.

Ramírez M. 2001. Otras zoonosis transmitidas por garrapatas: babesiosis y ehrlichiosis. Lyme and related diseases. First tick-borne Diseases Conference, University of Hull, Scarborough, UK.

Reardon J, Pierce K. 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet Pathol* 18(1): 48-61.

Reine J. 2004. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 19: 68-74.

Riera M, Rojas M, Zapata P. 2010. protocolo de extracción de dna por *salting-out* para

Rikihisa Y, Ewing S. 1992. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic Ehrlichial infection. J Clin Microbiol 30(1): 143-8.

Rikihisa Y, Ewing S. 1994. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. J Clin Microbiol 32(9): 2107-12.

Rikihisa Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev 4(3): 286-308.

Rikihisa, Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev 4(3): 286-308

Rímolo, M. 2006. Prevalencia serológica y citológica de la ehrlichiosis canina en Costa Rica. Tesis de grado. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Rioux A, Golvan, Honin R. 1964. Mixed *Hepatozoon canis* and *Leishmania canis* infection in a dog in the Sets area, France. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 39, 131-135.

Ristic M, Huxsoll D, Weisiger R, Hildebrandt P, Nyindo M. 1972. Serological Diagnosis of Tropical Canine Pancytopenia by Indirect Immunofluorescence. *Infection and Immunity*, 6(3), 226-231.

Rivero E, Neves C, Valenzuela M, Sousa S, Nunes F. 2006. Simple salting out method for DNA extraction from formalin – fixed, paraffin – embedded tissues. Pathology – Research and Practice 202, 523 – 529.

Rodríguez-Vivas R, Albornoz R, Bolio G. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, Mexico: Vet Parasitol. Jan 4;127(1):75-9.

Romero L, Meneses A, Salaza L, Jiménez M, J. Romero J, Aguiar D, Labruna M, Dolz G. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. Res. Vet. Sc. 91:95-97.

Sainz, A. 1996. Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb (tesis doctoral). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Sainz A, Roura X, Miró G, Peña A, Kohn B, Harrus S, Gallego S. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis un Europe. Parasites & Vectors 8:75

Sasanelli M, Paradies P, Lubas G, Otranto D, de Caprariis D. 2009. Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. *Vet Rec*, 3: 22-23.

Shaik M, Shivanna D, Kamate M, Vedamurty A, Vinod K. 2016. Single Lysis – Salting out method of genomic DNA extraction from dried blood spots. *Jurnal of clinical laboratory Analysis* 00:1-4.

Shankarappa B, Dutta S. 1992. Antigenic and genomic relatedness among *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia canis*. *Int J Syst Bacteriol* 42(1): 127-32

Skotarczak, B. 2003. Canine ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med*, 10(2):137-141.

Smith G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology*. 82, 565-585.

Smith R, Ristic M. 1975. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Infect Immun* 11(6): 1216-21.

Sparagano O, P. de Vos A. 2003. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J Vet Diagn Invest* 15(6): 527-34

Suksawat J, Pitulle C, Arraga-Alvarado C, Madrigal K, Hancock S. 2001. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *Journal of Clinical Microbiology*, 90-93.

Sultana Y, Jeffreys N, Watts M, Gilbert G, Lee R. 2013. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Strongyloides stercoralis* in Stool. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1048–1051. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0437>

Taniuchi M, Verweij J, Noor Z, Sobuz S, van Lieshout L, Petri W, Houpt E. 2011. High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 332–337. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0461>

Tesouro M, Sainz A. 1993. Concurrencia de ehrlichiosis canina con otras enfermedades hemáticas. II SISIET, Evora, Portugal

Trapp M, Dagnone A. 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet Parasitol* 140(3-4): 223-30.

Troy G, Vulganot J. 1980. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 16: 181-7.

Unver, A., Perez, M., Orellana, N., & Huang, H. a. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. *J Clin Microbiol*. 39(8):2788-2793.

- Varela F, Font X. 1997. Thrombocytopenia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*. J Vet Intern Med 11(5): 309-11
- Vargas G, Andre M. 2012. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. Veterinary Parasitology, 186, 254-260.
- Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro M. 2007. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. J. Clin. Microbiol. 45, 2716–3271.
- Walker H, Dumler S. 1997. Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. Arch Pathol Lab Med 121(8): 785-91.
- Waner, T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen A. 2001. Significance of serological testing for Ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. Vet Parasitol, v.95, p.1-15.
- Weisiger R, Ristic M. 1974. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. Am J Vet Res 36(5): 689-94.
- Weisiger R, Ristic M. 1975. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. Am J Vet Res 36(5): 689-94
- Weiss E, Dasch G. 1981. The Family Rickettsiae: pathogens of domestic animals and invertebrates: non-pathogenic arthropod symbiotes. In: The Procariotes. Berlin, Springer-Verlag: pp. 2161-71.
- Wen B, Rikihisa Y. 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. J Clin Microbiol 35(7): 1852-5.
- Wenyon M. 1931. Experimental infection of dogs with *Hepatozoon canis*. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 25, 6.
- Williams P, Giles T. 1998. Development and application of real-time quantitative PCR. In: Gene Quantification. F. Ferré (ed.), Birkhauser, Boston: pp. 313-25
- Woody J, Hoskins D. 1991. Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract 21(1): 75-98.