

Deteccción molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) con sospecha de hemoparásitos en clínicas veterinarias de Santa Tecla y San Salvador, El Salvador

Miranda-Tovar RE

Estudiante tesista

Facultad de Ciencias Agronómicas

Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: rafaelmirandamvz@gmail.com

Najarro- Flores RA

Estudiante tesista

Facultad de Ciencias Agronómicas

Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: robert.nf@hotmail.com

Navarrete- Hernández IV

Estudiante tesista

Facultad de Ciencias Agronómicas

Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: robert.nf@hotmail.com

Romero-Pérez LE

Docente Director

Facultad de Ciencias Agronómicas

Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: robert.nf@hotmail.com

Resumen

La investigación consistió en la detección molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Hepatozoon canis* y *Ehrlichia canis* en caninos con sospecha de hemoparásitos. Se realizó en diez clínicas veterinarias, las cuales se seleccionaron tomando en consideración criterios como la disponibilidad del médico veterinario, tener una afluencia mínima de 20 pacientes a la semana y poseer registros de todos sus pacientes, estas clínicas son pertenecientes a los departamentos de San Salvador y La Libertad, El Salvador. Se realizó durante el período de mayo 2016 a marzo 2017. El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue empleado en dos protocolos diferentes para la identificación de los cuatro agentes, a partir de una extracción de sangre de 100 animales sintomáticos, los cuales tenían que cumplir con tres criterios, poseer fiebre, historial de garrapatas y que su dueño autorizara la toma de muestra. Se evaluó la frecuencia de hemoparásitos individual y la presencia de coinfecciones, obteniéndose porcentajes relativamente altos: *Ehrlichia canis* 34%, *Anaplasma platys* 17% y *Babesia* spp. 21%. A nivel Centroamericano existe un porcentaje significativo en la detección de hemoparásitos en perros, que se asemeja mucho a los valores obtenidos en El Salvador. Los resultados para coinfecciones de dos agentes fueron: *Anaplasma-Ehrlichia* 4%, *Babesia-Ehrlichia* 4% y *Anaplasma-Babesia* 2%. En el caso de coinfecciones para tres agentes *Anaplasma-Babesia-Ehrlichia*, se detectó la presencia de 1%. No fue posible la detección de *Hepatozoon canis* en ninguna muestra. Finalmente, se adoptó en esta investigación una herramienta de utilidad para futuras investigaciones y para el diagnóstico de estos agentes en el país. Se reporta por primera vez la presencia de *Babesia canis vogeli* en El Salvador.

Palabras clave: Hemoparásitos, Perros, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, El Salvador, PCR.

Abstract

The research was conducted in ten veterinary clinics, which were selected taking into consideration criteria such as availability of the veterinarian, have a minimum flow of 20 patients a week and have records of all patients, these clinics are owned by departments San Salvador and La Libertad, El Salvador, during the period May 2016 to March 2017 and consisted of molecular detection of *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs with suspected blood parasites. The method of polymerase chain reaction (PCR), was used in two different protocols for the identification of four agents, from a blood sample of 100 symptomatic animals, which had to meet three criteria, possess fever, history of ticks and that its owner authorizes the taking of sample. The frequency of individual hemoparasites and the presence of co-infections were evaluated, obtaining relatively high percentages: *Ehrlichia canis* 34%, *Anaplasma platys* 17% and *Babesia* spp. twenty-one%. At the Central American level there is a significant percentage in the detection of hemoparasites in dogs, which closely resembles the values obtained in El Salvador. The results for co-infections of two agents were: *Anaplasma-Ehrlichia* 4%, *Babesia-Ehrlichia* 4% and *Anaplasma-Babesia* 2%. In the case of co-infections for three *Anaplasma-Babesia-Ehrlichia* agents, the presence of 1% was detected. It was not possible to detect *Hepatozoon canis* in any sample. Finally, a useful tool for future research and for the diagnosis of these agents in the country was adopted in this investigation. The presence of *Babesia canis vogeli* in El Salvador is reported for the first time.

Key words: Hemoparasites, Dogs, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, El Salvador, PCR.

Introducción

El término hemoparásitos define como aquellos parásitos capaces de reproducirse en células sanguíneas y el plasma, causando enfermedades en sus hospederos. *Babesia* spp. y *Hepatozoon canis* son parásitos protozoarios intraeritrocíticos del filo Apicomplexa (Jane, 2014) y aunque *Anaplasma* y *Ehrlichia* son bacterias gram negativas, intracelulares obligadas (Taylor *et al.*, 2016) y no parásitos en su definición exacta, en El Salvador se denominan como hemoparásitos debido a que estos poseen sintomatología similar difícil de distinguir.

Las enfermedades producidas por hemoparásitos pueden causar cuadros clínicos graves y en algunas ocasiones producen la muerte de las mascotas, por lo que resulta importante identificar las especies de parásitos que causan estas enfermedades, poniendo además de manifiesto su importancia en la salud humana, ya que han sido asociadas incluso a presentarse en seres humanos por la picadura de vectores, que en el caso de los agentes en estudio poseen como vector a la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Romero *et al.*, 2011).

En Centro América los países que más han investigado sobre Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Babesiosis y Hepatozoonosis son Costa Rica, Panamá y Nicaragua (Romero *et al.*, 2011; Santamaría *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014), reflejando en algunos casos porcentajes elevados de positividad, detectándose además coinfecciones que dificultan el diagnóstico al manifestar sintomatología similar. En la región, se ha demostrado la utilidad de las pruebas moleculares en el diagnóstico diferencial, incluso en animales asintomáticos, lo que representa una gran ventaja para el control de estas enfermedades (Romero *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2014).

Existen métodos directos e indirectos para determinar la presencia de hemoparásitos en caninos, pero en El Salvador, se ha realizado únicamente serología para ehrlichiosis y se reporta el hallazgo de mórulas compatibles con *Ehrlichia canis* en frotis sanguíneos; sin embargo, debido a los síntomas generales de la enfermedad, se asocia mucho a cualquier enfermedad febril con presencia de trastornos hematológicos.

Hasta la fecha en El Salvador no se han realizado estudios de detección de antígenos por diagnóstico molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp, *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*. Las finalidades de la presente investigación es evidenciar mediante la técnica de PCR la presencia de los agentes anteriormente mencionados y proveer al país de una herramienta

diagnóstica más específica para su uso en la identificación de hemoparásitos en perros, debido a que los signos y síntomas clínicos son muy parecidos, lo cual hace difícil su diagnóstico diferencial.

Materiales y métodos

Ubicación geográfica

La investigación se realizó en tres clínicas veterinarias de Santa Tecla, La Libertad, El Salvador y siete clínicas veterinarias ubicadas en la región metropolitana de San Salvador, El Salvador, incluyendo la Clínica Veterinaria de especies menores de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. La selección inicial de las clínicas participantes, fue realizada por la disposición de sus propietarios de compartir información de sus pacientes con sospechas de hemoparásitos. El procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Duración de la investigación

El análisis de las muestras se realizó entre mayo 2016 a marzo de 2017 y comprendió dos fases: una de recolección de muestra y otra de análisis propiamente dicho de laboratorio en donde se procesaron por la técnica de PCR.

Metodología de campo

Para el desarrollo del estudio, se realizó una encuesta con el fin de obtener información de las clínicas en relación a los métodos de diagnóstico para confirmar las enfermedades de interés del estudio, identificar los síntomas asociados y la cantidad de casos que se presentan semanalmente; asimismo, se informó al dueño de la mascota sobre el estudio a realizar y se solicitó la firma del consentimiento informado, para la autorización de la toma de sangre y evaluación de la presencia de los agentes bajo investigación.

Características para la selección de las clínicas veterinarias

Las clínicas veterinarias que participaron en la investigación cumplieron con ciertos criterios de selección tales como: disponibilidad del médico veterinario para participar en el estudio, presencia de registro de información actualizado de cada paciente, asistencia de al menos 20 pacientes por consulta a la semana.

El Médico Veterinario se comprometió a estar en comunicación para informar sobre la toma de muestras y para la recolecta de las mismas cada semana, lo que aseguró que las muestras no perdieran su calidad (Matamala, 2009). Además, completó un registro e historial clínico de cada paciente y así se verificó que contara con los requisitos planteados en la investigación.

Selección de animales

Los criterios que se tomaron para poder seleccionar los caninos a muestrear fueron: el propietario debía estar dispuesto a llenar una ficha de información general de su mascota, además de estar de acuerdo en la toma de muestra, que el Médico Veterinario de cabecera y/o responsable de la clínica veterinaria sospechara de una enfermedad producida por hemoparásitos con presencia de síntomas relacionados a los agentes a investigar, presentar proceso febril que no estuviera relacionado con alguna otra enfermedad y debía poseer antecedentes previos a infestación con garrapatas (6-12 meses). Se estableció una cantidad de diez muestras por clínica participante.

Después de haber obtenido esta información se procedió a recolectar la muestra de sangre ya sea de la vena cefálica o femoral en tubos de ensayo plásticos con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) con capacidad para 3 ml de sangre entera, la cual fue debidamente rotulada e identificada (Nombre, edad, procedencia). Para la extracción se utilizaron jeringas descartables de 3 a 5 ml. Una vez obtenida la muestra se mantuvo a temperatura ambiente por un lapso de cuatro horas sin necesidad de refrigeración, en caso de exceder este tiempo se refrigeró a una temperatura de 4°C.

Las muestras fueron transportadas desde la clínica veterinaria hasta el lugar de procesamiento en cajas herméticas o hieleras tipo Coleman de forma ordenada y segura en gradillas o receptáculos que impidieron el volcamiento o golpes. Los contenedores llevaban en su fondo un material absorbente para que todo derrame involuntario producido por accidente fuera absorbido.

Metodología de laboratorio

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 100 muestras de sangre entera provenientes de los caninos previamente seleccionados. Para tal fin, se empleó el “High Pure PCR Template Preparation Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante (Manual de procedimientos incorporado en cada “High Pure PCR Template Preparation Kit”).

Brevemente, se obtuvo el ADN de 200 µl de sangre entera a través de procesos de lavado y centrifugación, el producto se almacenó a +2 +8 °C para su utilización el mismo día o -20 °C para su posterior utilización.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR para la detección de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., y *Hepatozoon canis*.

Se realizó la PCR en búsqueda de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp y *Hepatozoon canis*, empleando el protocolo de diagnóstico desarrollado por Kledmanee *et al.*, 2009 que consiste en un Multiplex PCR empleando secuencia de cebadores establecidos en dicho protocolo (Cuadro 1).

Cuadro 1: Secuencia de cebadores para la detección de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp, *Hepatozoon canis* y *A. platys*

Patógeno	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehr1401F	CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTACAA	380pb
	Ehr1780R	TGGATAATAAAAACCGTACTATGTATGCTAG	
<i>Babesia</i> spp.	Ba103F	CCAATCCTGACACAGGAGGTAGTGACA	619pb
	Ba721R	CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCTCAAG	
<i>Hepatozoon canis</i>	Hep001F	CCTGGCTATACATGAGCAAAATCTCAACTT	737pb
	Hep737R	CCAAGTGTCCCTATCAATCATTAAGC	
<i>Anaplasma platys</i>	PLATYS	GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG	678pb
	Ehr16Sr	TAGCACTCATCGTTTACAGC	

El protocolo de amplificación fue realizado de acorde a Kledmanee *et al.*, 2009, tomando en cuenta que se realizaron modificaciones en tiempo y temperatura, de la siguiente manera:

Cada tubo de reacción constó de 50 µl, conteniendo 5 µl de ADN extraído de la muestra problema, 0.4 pmol de cada primer, 300 µM de cada dNTP, 4 U de Taq ADN polimerasa, 1X de PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂ y agua estéril. El termociclaje se realizó en un termociclador Mastercycler Eppendorf Flexlid y consistió de 7 minutos a 95 °C seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 70 segundos a 61 °C y 70 segundos a 72 °C, con un paso final de extensión de 5 minutos a 72 °C, luego 4° por tiempo indefinido. El producto amplificado se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelRed® en una cámara de electroforesis BioRad minisub y se observó bajo Luz Ultravioleta en un transiluminador Spectroline ultraviolet, considerándose como muestra positiva aquella que presentó una banda visible en la gel.

PCR para la detección de *Anaplasma platys*

Para el caso de PCR en busca de *Anaplasma platys*, se empleó el protocolo desarrollado por Martin *et al.*, (2005) y Gal *et al.*, (2007); empleando secuencia de cebadores establecidos en dicho protocolo (Cuadro 1), tomando en cuenta que se realizó modificaciones en tiempo y temperatura:

Cada tubo de reacción constó de 50 µl, conteniendo 5 µl de ADN extraído de la muestra problema, 12.5 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1.25 U de Taq ADN polimerasa, 1X de PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 3 mM MgCl₂ y agua estéril. El termociclaje se realizó en un termociclador Mastercycler Eppendorf Flexlid y consistió de 7 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 34 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C, con un paso final de extensión de 5 minutos a 72 °C, luego a 4 °C por un tiempo indefinido. El producto amplificado se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelRed® en una cámara de electroforesis BioRad minisub y se observó bajo Luz Ultravioleta en un transiluminador Spectroline ultraviolet, considerándose como muestra positiva aquella que presentó una banda visible en la gel.

Metodología estadística

Una vez obtenida la información de laboratorio se analizaron los resultados haciendo uso de métodos estadísticos descriptivos.

Resultados y Discusión

Se evaluó la presencia de *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*; en una población de 100 caninos con sospechas de hemoparásitos, mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los caninos en estudio fueron un total de 52 hembras y 48 machos con edades que oscilaron entre 1 y 14 años de edad.

Del total de muestras analizadas por la técnica de PCR, se demostró la presencia de al menos un agente en el 60% de las muestras, identificando *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. y *Anaplasma platys*, no detectándose *Hepatozoon canis* en ninguna de las muestras analizadas. El no hallazgo de *H. canis* en el este estudio no implica la ausencia del agente en las muestras analizadas, ya que deben considerarse factores que influyen en el resultado. Esto se respalda ya que, al obtener resultados negativos en todas las muestras, se procedió a realizar una evaluación de las secuencias de los primers empleados en el protocolo utilizado para de identificación de

H. canis, a través de la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST). El BLAST, es un programa que compara secuencias de nucleótidos en una base mundial y calcula la significancia estadística demostrando similitud con secuencias disponibles de agentes específicos (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De esta manera se demostró que los primers empleados no detectan todas las cepas de *H. canis* y por lo tanto, la ausencia en este estudio podría deberse a que se trate de una cepa que no se reconoce con la secuencia desarrollada para el protocolo utilizado. La ausencia del agente en nuestro medio resulta muy difícil de respaldar debido a que en la región, países como Nicaragua y Costa Rica lo han reportado en estudios recientes en sangre de perros, con porcentajes de detección que varían entre el 7.5% al 51% (Rojas *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014).

El porcentaje de hallazgo (60%) al menos a un agente, en este estudio, concuerda con los porcentajes de investigaciones realizadas en la región centroamericana, en donde Costa Rica reporta 47% (Rojas *et al.*, 2014), Nicaragua 80% (Wei *et al.*, 2014) y Panamá 70.6% (Santamaria *et al.*, 2014) de hallazgo, al menos a un agente en sangre de perros. El total de porcentaje de positividad a las pruebas de PCR, incluyendo co-infecciones, fue el siguiente: *Ehrlichia canis* 34% (34 muestras), *Anaplasma platys* 17% (17 muestras) y *Babesia* spp. 21% (21 muestras) (Fig. 1).

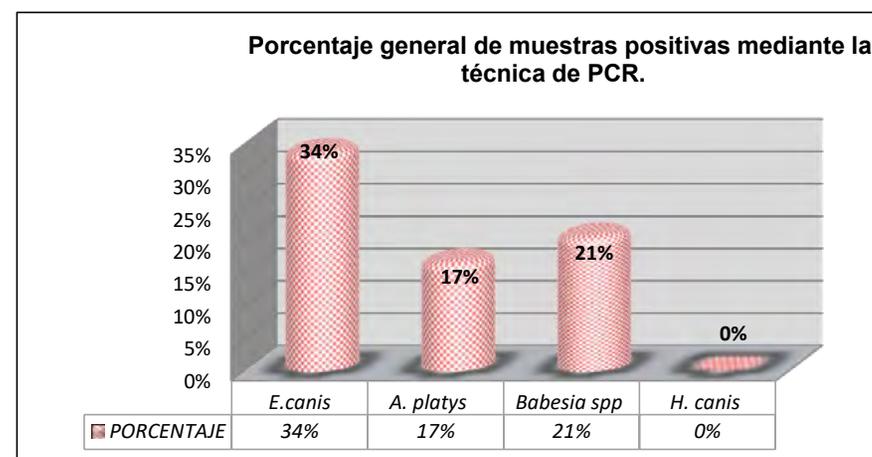


Figura 1. Porcentaje general de muestras positivas mediante la técnica de PCR.

Investigaciones similares en la región centroamericana, determinaron porcentajes variables de presencia de cada hemoparásito. El presente estudio evidenció hallazgos a *Ehrlichia canis* (34%) similares a una investigación en Costa Rica (34%) (Rojas *et al.*, 2014) pero inferior a otras investigaciones realizadas en Nicaragua (56%), Costa Rica (47.7%) y Panamá (64.2%) (Wei *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2011; Santamaría *et al.*, 2014), es importante mencionar, que en los primeros dos estudios, se realizó la búsqueda de diferentes agentes en animales con y sin síntomas sospechosos; mientras que en los últimos dos estudios se realizó la investigación únicamente con animales sintomáticos. El estudio presentó para *Anaplasma platys* (17%) resultados superiores a Nicaragua (13%) y Costa Rica (10%) (Wei *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014) pero resultados inferiores con respecto a Panamá (21.3%) (Santamaría *et al.*, 2014); pero esto puede estar influenciado porque únicamente en Panamá se efectuó la investigación exclusivamente con animales sintomáticos. Para el caso de *Babesia spp.* (21%) se obtuvieron resultados similares a otras investigaciones en la región como el caso de Costa Rica (25%) y Nicaragua (26%) (Wei *et al.*, 2014), pero superior a otro estudio realizado en Costa Rica en 2014 (8%) (Rojas *et al.*, 2014) que reportó menor porcentaje al resto de los estudios; sin embargo, este último era específico para la búsqueda de la especie *Babesia canis vogeli*, sin incluir a otras especies.

Al evaluar las coinfecciones en la presente investigación, los resultados demuestran un 10% de coinfección a dos agentes (*Ehrlichia - Anaplasma* 4%, *Ehrlichia-Babesia* 4% y *Anaplasma-Babesia* 2%) y un 1% a tres agentes (*Ehrlichia - Anaplasma - Babesia*) (Cuadro 2) (Fig. 2).

Cuadro 2. Distribución de agentes, en infecciones simples y co-infecciones, en muestras positivas por las técnicas de PCR.

Detalle de resultados de muestras positivas

Muestras positivas	# de muestras	Porcentaje
<i>E. canis</i>	25	25%
<i>A. platys</i>	10	10%
<i>Babesia spp</i>	14	14%
<i>E. canis + A. platys</i>	4	4%
<i>E. canis + Babesia spp</i>	4	4%
<i>A. platys + Babesia spp</i>	2	2%
<i>E. canis + A. platys + Babesia spp.</i>	1	1%
Total de muestras positivas	100	60%

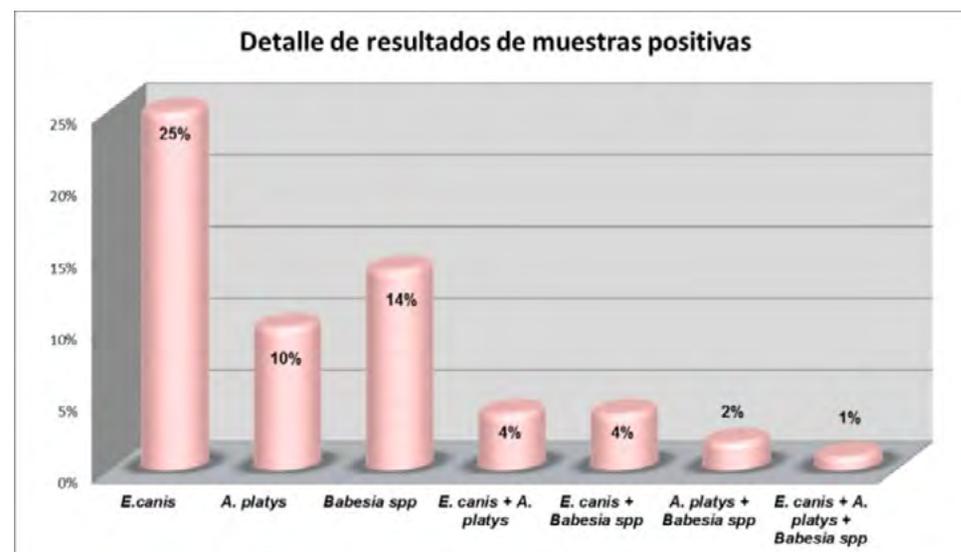


Figura 2. Detalle de resultados de muestras positivas.

En la región, Costa Rica ha evidenciado, en diferentes estudios, la presencia de co-infecciones para dos agentes (10% al 12.3%), para tres agentes (2.5%) y para cuatro (2.5%) (Rojas *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014). También Panamá ha reportado co-infecciones entre *E. canis* y *A. platys* (7.5%) y Nicaragua presenta porcentajes de co-infecciones para dos (28%), tres (8%) y cuatro (10%) agentes en una misma muestra (Santamaría *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014). En los estudios anteriormente mencionados, los resultados de coinfecciones se relacionan con los agentes *A. platys*, *Babesia spp.* y *E. canis*, además de otros no estudiados en la presente investigación.

La presencia de coinfecciones en el presente estudio no es un hallazgo extraño, ya que diferentes investigaciones en Latinoamérica señalan a *Rhipicephalus sanguineus* como el principal vector de los cuatro agentes en estudio (Romero *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2014). Estudios en diferentes zonas tropicales han señalado factores en común que favorecen la prevalencia de los vectores y por lo tanto los agentes asociados, estos factores incluyen: el clima tropical, el aumento de viajes y el transporte de animales de una región a otra (Rojas *et al.*, 2014).

Se consideró someter a evaluación las variables edad, sexo y raza de los caninos; no encontrando resultados significativos debido a no ser un factor predisponente para la infección por hemoparásitos (Romero *et al.*, 2011).

La importancia de este estudio también radica en la implementación de una prueba molecular como herramienta diagnóstica confiable y sensible. El diagnóstico de estas enfermedades en el país, está basado en frotis sanguíneos, pruebas serológicas rápidas y sintomatología clínica. Estas formas de diagnóstico, poseen limitantes importantes: el frotis sanguíneo posee baja especificidad y sensibilidad ya que solo identifica estructuras compatibles a algunos agentes y en el caso de las pruebas serológicas únicamente detecta anticuerpos, lo cual indica la exposición al agente sin discriminar entre infecciones pasadas o presentes, además poseen la desventaja de presentar reacciones cruzadas y la falta de reacción ante la ausencia de anticuerpos en infecciones recientes (Romero, *et al.*, 2011). En relación al diagnóstico por sintomatología, este es difícil de realizar, debido a que los tres agentes encontrados presentan una sintomatología similar y el diagnóstico clínico resulta ser poco confiable ya que no solo puede causar confusión entre estos agentes sino con los de otras enfermedades en caninos (Rojas, *et al.*, 2014).

Por lo antes descrito, las técnicas moleculares representan gran utilidad por su alta sensibilidad y especificidad. Estas técnicas detectan el material genético del propio patógeno, lo que demuestra claramente la presencia del mismo en la muestra. También las infecciones latentes o tempranas pueden ser detectadas por PCR antes de que los síntomas de la enfermedad sean apreciables ya que la detección no depende de los niveles de anticuerpos (Otranto *et al.*, 2011).

Como un aporte a la presente investigación, se realizó la secuenciación de seis muestras de ADN positivas a las pruebas de PCR para *Ehrlichia canis* (5 de 6 muestras), *Babesia* spp. (1 de 6 muestras) y *Anaplasma platys* (4 de 6 muestras). Inicialmente nueve muestras fueron enviadas al Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saude Animal Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil, en donde se procedió a realizar el proceso para secuenciación, siendo posible el análisis en seis de las nueve muestras (tres muestras con resultados positivos a *Babesia* en el presente estudio no pudieron ser procesadas para secuenciación) (Cuadro 3).

Los resultados obtenidos en Brasil concuerdan con los resultados generados en la presente investigación, permitiendo además identificar una muestra positiva de *Babesia* spp. como *Babesia canis vogeli*, especie de la cual ya se tienen reportes en la región en estudios desarrollados en Nicaragua y Costa Rica (Wei *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014).

Se presentó una única diferencia en una de las muestra, en la cual el presente estudio detectó *Anaplasma platys* y durante el proceso de análisis en Brasil se detectó además *Ehrlichia canis*, esto se explica debido a que en Brasil se realizó un PCR anidado previo a la secuenciación, el PCR anidado consiste en buscar una secuencia del agente dentro de una secuencia previamente obtenida por PCR y tiene la ventaja de incrementar la sensibilidad de la prueba, pudiendo detectar cargas bajas de la bacteria, por lo que se recomienda para detección de animales con presencia del agente *Ehrlichia canis* de manera subclínica; estas cargas bajas pueden presentarse en perros por períodos de por lo menos 34 meses sin manifestación de enfermedad. Cuando los agentes se encuentran causando enfermedad, estos están en niveles detectables por PCR convencional, por lo que puede ocurrir que el hallazgo en esta muestra se deba a la presencia subclínica de *Ehrlichia canis* en el perro del cual se obtuvo la muestra.

Cuadro 3. Comparación de resultados de seis muestras positivas por PCR en El Salvador y secuenciación en Brasil

Código	Agente identificado. PCR, El Salvador	Agente identificado. Secuenciación, Brasil.
VPC110416	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
CVM110616	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Ehrlichia canis</i> *
		<i>Anaplasma platys</i>
VPC101016	<i>Ehrlichia canis</i> ,	<i>Ehrlichia canis</i> ,
	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
VSP080216	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
VSP090316	<i>Ehrlichia canis</i> ,	<i>Ehrlichia canis</i> ,
	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
VLH011017	<i>Babesia</i> spp.,	<i>Babesia canis vogeli</i> ,
	<i>Ehrlichia canis</i> ,	<i>Ehrlichia canis</i>
	<i>Anaplasma platys</i> ^Δ	

* No identificada en las pruebas de PCR realizadas en El Salvador

^Δ Muestra no procesada para secuenciación de Brasil

Los resultados obtenidos en Brasil, confirman los resultados de las pruebas de PCR realizadas en la presente investigación, demostrando que la prueba puede ser empleada para el diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. y *Anaplasma platys* en sangre de perros. Este se convierte en el primer estudio en identificar molecularmente los agentes antes mencionados y demuestra la circulación de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* y *Anaplasma platys* en perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos en El Salvador.

Finalmente, es importante tomar en consideración que el restante 40% de las muestras que mostró resultados negativos en el estudio, puede deberse a la ausencia de los agentes patógenos y presencia de otras enfermedades infecciosas, debido a que en esta investigación todos los pacientes manifestaron síntomas clínicos y fueron muestreados bajo la sospecha de hemoparásitos; pero también la no detección puede deberse a la presencia de los mismos en cantidades bajas no detectables por la prueba, lo cual ocurre en animales afectados de forma subclínica, también la presencia de *Hepatozoon canis* puede representar un porcentaje de negatividad menor ya que no fue posible realizar su identificación.

Conclusiones

El no hallazgo de *Hepatozoon canis* en el presente estudio no implica la ausencia del agente en las muestras analizadas, debiendo considerarse aspectos que pudieran influir en este resultado.

De acuerdo al proceso de secuenciación realizada en Brasil, se confirma la utilidad de esta prueba para el diagnóstico en muestras de sangre entera de perros de nuestro país para *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. y *Anaplasma platys*.

Mediante secuenciación en una muestra positiva a *Babesia* spp., se identificó la especie *Babesia canis vogeli*, con una similitud del 100% con secuencias disponibles en el GenBank al realizar el análisis a través del BLAST.

Un 40% de muestras resultaron negativas a alguno de los agentes investigados; sin embargo, debe considerarse que estos animales presentaron sintomatología sospechosa a hemoparásitos por lo que no puede descartarse la presencia de algún agente patógeno no evaluado en el presente estudio.

Este se convierte en el primer estudio de identificación molecular en nuestro país para los agentes investigados, confirmando la presencia de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Babesia canis vogeli* en perros de El Salvador, detectándose además co-infecciones entre los agentes en mención.

Recomendaciones

Ampliar la investigación a nivel nacional para la detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* y *Hepatozoon canis* en sangre de perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos.

Realizar nuevos estudios de búsqueda de *Hepatozoon canis*, para corroborar la presencia o ausencia del agente en perros de El Salvador.

Considerar el empleo de esta técnica molecular para determinar la presencia de co-infecciones en perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos para el diagnóstico certero de estas enfermedades.

Se debe tomar en cuenta los resultados de la presente investigación para considerar la aplicación de tratamientos orientados al control de los diferentes agentes presentes en perros con sintomatología sospechosa a hemoparásitos en El Salvador.

Realizar otros estudios con la finalidad de evidenciar la presencia o ausencia de otras especies de *Babesia* distintas a *Babesia canis vogeli* en perros de El Salvador.

Bibliografía

- Gal. A; Loeb.E; Mekusas.Y; Baneth. G. 2007. Detection of Ehrlichia canis by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. The Veterinary Journal. 1-6.
- Jane E. Sykes, 2014. Canine and Feline Infectious Diseases.ELSEVIER. Anaplasmosis, pag 290-300, Babesiosis, pag 727-738, Ehrlichiosis, pag 278-289 y Hepatozoonosis, pag 747-760, pp915.
- Kledmanee. K; Suwanpakdee. S; Chatsiriwech. J; Suksai. P; Suwannachat. P; Sariya. L; Buddhirongawatr. R; Charoonrut. P; Chaichoun. K. 2009. Thailandia. Development of multiplex Polymerase chain reaction for detection of Ehrlichia canis, Babesia spp and Hepatozoon canis in canine blood. Vol.40: 1-5.
- Martin. A; Brown. GK; Dunstan. RH; Roberts.TK. 2004. Anaplasma platy: an improved PCR for its dectection in dogs. Experimental parasitology.109:176-180.

- Matamala, I. 2009. Conservación de muestras clínicas (En línea). Consultado el 28 Oct. 2015. Disponible en <http://200.72.142.194/chp/chpftp/ConservacionMuestrasLaboratorio.pdf>.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa M, Stanneck D, Decaprarriis D, Capelli G, Baneth G. 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors* 4: 55.
- Rojas, A; Rojas, D; Montenegro, D; Gutiérrez, R; Yasur-Landau, D; Baneth, G. 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Veterinary parasitology* 199: 121-128.
- Romero, L.E.; Meneses, A.I.; Salazar, L.; Jimenez, M.; Romero, J.J.; Aguiar, D.M.; Labruna, M.B.; Dolz, G. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Research in Veterinary Science* 91:95-97.
- Santamaria. A, Calzada. JE, Saldaña. A, Yabsley. MJ, Gottdenker. NL. 2014. Molecular diagnosis and species identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in dogs from Panama, Central America. *Vector borne and zoonotic diseases* 14(5):368-70
- Taylor M.A, Coop R.L, Wall R.L. 2016. *Parasites of dogs and cats*. *Veterinary parasitology* 12: 48-54.
- Wei. L; Kelly. P; Ackerson. K, Zhang. J, El-Mahallawy. HS, Kaltenboeck. B, Wang. 2014. First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasites & Vectors* 7:26.