

Identification of bacteria from the Anaplasmataceae family in dog shelter of the municipality of Caldas, Antioquia

Identificación de bacterias de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia

John Posada-Zapata¹ MV, Azucena Cabrera J¹ MV, Dubán González-Alvarez¹ M.Sc, Juan D. Rodas² Ph.D, Santiago Monsalve B¹ M.Sc, Andrés F. Londoño^{1*} M.Sc.

¹Corporación Universitaria Lasallista (CUL), Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria – GIVET, Carrera 51 Nro. 18-62, Caldas, Colombia.

²Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias – CENTAURO, Calle 70 Nro. 52-21, Medellín, Colombia. *Correspondence: pipelb@gmail.com

Received: November 2016; Accepted: February 2017.

ABSTRACT

Objective. It was to detect the circulation of microorganisms of the family Anaplasmataceae in a canine albergue of the municipality of Caldas. **Materials and methods.** In view of the above, a descriptive study was conducted in 46 dogs (*Canis lupus familiaris*) to evaluate the presence of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. by molecular techniques or by immunodiagnostic, in a dog shelter of the municipality of Caldas. The DNA extraction was done in whole blood samples with EDTA. Primers were used against *dsb* and *groEL* genes to detect *Ehrlichia* and *Anaplasma* sequences respectively and phylogenetic analyzes of the sequences obtained were also carried out. On the other hand, SNAP 4DX[®] was used for serodiagnosis. **Results.** In the molecular testing, five positive samples were obtained for the *Ehrlichia* test and three for the *Anaplasma* test. In the serological tests, three individuals were positive for *Ehrlichia* spp., three for *Anaplasma* spp. and for the other trials measured by the SNAP (*Dirofilaria immitis* y *Borrelia burgdorferi*) the result was negative. **Conclusions.** It demonstrated the circulation of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in a dog shelter of the municipality of Caldas, Antioquia.

Keywords: *Anaplasma*, diagnosis, *Ehrlichia canis*, PCR, serology (Source: CAB).

RESUMEN

Objetivo. Fue detectar la circulación de microorganismos de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio descriptivo en 46 perros (*Canis lupus familiaris*) para evaluar por técnicas moleculares o por inmunodiagnóstico la presencia de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp., en un albergue canino del municipio de Caldas. Se hizo extracción de ADN en muestras de sangre entera con EDTA y se utilizaron cebadores contra los genes *dsb* y *groEL*, para detectar secuencias de *Ehrlichia* y *Anaplasma* respectivamente y análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas. Por otro lado se usó el SNAP 4DX[®] para el serodiagnóstico. **Resultados.** En las pruebas moleculares se obtuvieron cinco muestras positivas para *Ehrlichia* y tres para *Anaplasma*. En las pruebas serológicas, tres individuos fueron positivos para *Ehrlichia* spp., tres para *Anaplasma* spp. y negativos para los demás ensayos medidos por el SNAP (*Dirofilaria immitis* y *Borrelia burgdorferi*). **Conclusiones.** Se demostró la circulación de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en un albergue del municipio de Caldas, Antioquia.

Palabras clave: *Anaplasma*, diagnóstico, *Ehrlichia canis*, PCR, serología (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

Ehrlichia and *Anaplasma* are bacteria genus with some species bearing a zoonotic character. Such genera belong to the Rickettsia order (Anaplasmataceae family) and transmitted by vectors (ticks and fleas) (1,2).

The *Ehrlichia* genus is comprised by six species, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. mineirensis* and *E. ruminantium* (3). All species of *Ehrlichia* infect vertebrate hosts, and all of them are transmitted by ticks. *E. chaffeensis* and *E. ewingii* are demonstrated agents in clinical human cases in North America, while *E. canis*, *E. ruminantium*, and *E. ewingii* are pathogens mainly with veterinary relevance (4). The species recognized in the *Anaplasma* genus are *A. phagocytophilum*, *A. platys* (previously *Ehrlichia platys*), *A. marginale* (*A. marginale* subspecies *centrale*), *A. bovis* (previously *E. bovis*), *A. caudatum*, and *A. ovis* (3). *A. phagocytophilum* infects humans and many animal species producing different diseases known as human granulocytic anaplasmosis (HGA; formerly known as human granulocytic ehrlichiosis), canine granulocytic anaplasmosis (formerly known as canine granulocytic ehrlichiosis), and equine granulocytic anaplasmosis (formerly known as equine granulocytic ehrlichiosis). Dog platelets are the target cells of *A. platys*, causing canine cyclic thrombocytopenia, while *A. marginale*, *A. bovis*, and *A. ovis* infect the erythrocytes of domestic and wild ruminants (4). Frequency and experimental studies have demonstrated infection with an acute disease and changes in hematological values by different agents of the anaplasmataceae family (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *Anaplasma phagocytophilum*) in dogs (5,6). In Colombia, different species of microorganisms of the family Anaplasmataceae have been detected in ticks collected in domestic animals (7).

There is a growing interest in detection of these microorganisms due to their negative effects on human and domestic canine health, especially in the life cycle of these pathogens in abandonment conditions. Due to its geographic location, reservoir diversity, vectors, and mainly tropical weather conditions, Colombia gathers all the conditions that favor vector dissemination (8). Diseases caused by bacteria of the *Ehrlichia* and *Anaplasma* genera may evolve similarly to other febrile pathologies in dogs, and therefore many of them may remain undiagnosed or misdiagnosed. The purpose of this work was to detect the circulation of Anaplasmataceae microorganisms in a dog shelter in the municipality of Caldas.

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia y *Anaplasma* son géneros bacterianos con algunas especies de carácter zoonótico. Dichos géneros pertenecen al orden Rickettsiales, (familia Anaplasmataceae) y los son transmitidos por vectores (garrapatas y pulgas) (1,2).

El género *Ehrlichia* se compone de seis especies, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. mineirensis* y *E. ruminantium* (3). Todas las especies de *Ehrlichia* infectan hospederos vertebrados y son transmitidas por garrapatas. *E. chaffeensis* y *E. ewingii* son agentes demostrados de casos clínicos humanos en Norte América, mientras que *E. canis*, *E. ruminantium* y *E. ewingii* son patógenos principalmente de importancia veterinaria (4). Las especies reconocidas del género *Anaplasma* son *A. phagocytophilum*, *A. platys* (antes *Ehrlichia platys*), *A. marginale* (*A. marginale* subespecie *centrale*), *A. bovis* (antes *E. bovis*), *A. caudatum* y *A. ovis* (3). La especie *A. phagocytophilum* infecta a los seres humanos y a muchas especies de animales produciendo diferentes enfermedades conocidas como anaplasmosis granulocítica humana (HGA; anteriormente ehrlichiosis granulocítica humana), anaplasmosis granulocítica canina (anteriormente ehrlichiosis granulocítica canina) y anaplasmosis granulocítica equina (anteriormente ehrlichiosis granulocítica equina). Las células blanco de *A. platys* son las plaquetas de los perros, siendo el agente causal de la trombocitopenia cíclica canina, mientras que *A. marginale*, *A. bovis* y *A. ovis* infectan a los eritrocitos de rumiantes domésticos y silvestres (4). Tanto en estudios de frecuencia y experimentales ha sido demostrada la infección con enfermedad aguda y modificación en los valores hematológicos por parte de diferentes agentes de la familia anaplasmataceae (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*) en ejemplares caninos (5,6). En Colombia se han detectado diferentes especies de microorganismos de la familia Anaplasmataceae en garrapatas recolectadas en animales domésticos (7).

Existe un creciente interés en la detección de estos microorganismos debido a sus efectos adversos sobre la salud humana y en ejemplares caninos domésticos, especialmente en el ciclo de vida de estos patógenos en poblaciones en condiciones de abandono. Colombia, por su ubicación geográfica, diversidad de reservorios, vectores y características climatológicas de predominio tropical, reúne todas las condiciones que favorecen la diseminación de vectores (8). Las enfermedades causadas por bacterias del género *Ehrlichia* y *Anaplasma* pueden cursar

MATERIALS AND METHODS

Geographic areas of study. Samples were collected from dogs living in a dog shelter in Caldas, Antioquia, La Miel Township, 3 km away from the urban part, at an average altitude of 1,750 meters above sea level, and an average temperature of 19°C.

Samples. The sample collection, serological and molecular detection processes were carried out between March 2015 and March 2016. A descriptive study was made, using a sample (obtained for convenience) of 46 individuals out of a total 110 dogs. Two blood samples were taken from the cephalic vein, one in EDTA tubes and another one in tubes with no anticoagulant. Then, these samples were taken to the "Hno. Marco Antonio Serna f.s.c. Clinical Diagnostic Veterinary Laboratory" of Corporación Universitaria Lasallista (Lasallean University Corporation). Blood serum was separated in a centrifuge at 4000 rpm/10 minutes and all samples were stored at -20°C until the time of analysis. The study was approved by the animal experimentation ethics committee of Corporación Universitaria Lasallista, minute No. 8 of June 06, 2013.

Hemogram. In order to carry out the hemogram, we used whole blood with EDTA and the Abacus Junior Vet®, Diatron normalized hematologic analysis device.

DNA extraction. DNA was extracted from blood with EDTA using the Thermo Scientific tissue ADN purification® kit, following manufactured recommendations. Then we assessed the integrity of the DNA by electrophoresis and its quality by spectrophotometry. Then, DNA was stored at 4°C for 12 hours and then frozen at -20°C until its use in conventional PCR.

Molecular tests. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used. To diagnose bacteria of the *Ehrlichia* spp. Genus we used the *dsb*-330 (5'GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT 3') and *dsb*-728 (5'CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT 3') primers, which amplify a 409-pb segment of the *dsb* (9). Thermal cycling conditions were 98°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 98°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 60 seconds, a final extension of 72°C for 5 minutes, and 4°C until verifying the reaction results in a gel.

For *A. platys* we used the *pla*-HS475F (5'AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA 3') and *pla*-HS1198R (5'CATAGTCTGAAGTGGAGGAC 3') primers, which amplify a 724-pb fragment of the

de forma similar a otras patologías febriles en caninos, por tal razón muchos casos quedan sin diagnóstico o con un diagnóstico erróneo. El objetivo del presente trabajo fue detectar la circulación de microorganismos de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas geográficas de estudio. Las muestras provienen de ejemplares caninos que residen en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia, vereda La Miel, a 3 kilómetros del casco urbano, una altitud promedio de 1.750 msnm y temperatura promedio de 19°C.

Muestras. El proceso de toma de muestras, detección serológica y molecular fue realizado entre marzo del 2015 y marzo del 2016. Se hizo un estudio descriptivo, usando una muestra (obtenida por conveniencia), de 46 individuos de un total de 110 caninos. Dos muestras de sangre fueron recolectadas de la vena cefálica de cada uno de los perros, una en tubos con EDTA y otra en tubos sin anticoagulante. Luego, estas muestras fueron transportadas al "Laboratorio de diagnóstico clínico veterinario Hno. Marco Antonio Serna f.s.c." de la Corporación Universitaria Lasallista. El suero sanguíneo se separó por centrifugación a 4000 rpm/10 minutos y todas las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C, hasta el momento de su análisis. El estudio contó con el aval del comité de ética para experimentación con animales de la Corporación Universitaria Lasallista, acta No. 8 de junio 06 de 2013.

Hemograma. Para la realización del hemograma se usó la sangre entera con EDTA y el equipo para análisis hematológico normalizado Abacus Junior Vet®, Diatron.

Extracción de ADN. La extracción de ADN se hizo a partir de sangre con EDTA, usando el kit Thermo Scientific tissue ADN purification® siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación se evaluó la integridad del ADN por electroforesis y la calidad del mismo por medio de espectrofotometría. Posterior a esto, el ADN se almacenó en refrigeración a 4°C por 12 horas y luego se llevó a congelación a -20°C hasta su uso en PCR convencional.

Pruebas moleculares. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para diagnóstico de bacterias del género *Ehrlichia* spp. se usaron los iniciadores *dsb*-330 (5'GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT 3') y *dsb*-

groEl gene. Thermal cycling conditions were 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 90 seconds, with a final extension of 72°C for 5 minutes, and 4°C until verifying the reaction results in an Agarose gel (10,11). For both reactions, we used the PCR Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo®) kit, which uses a final volume of 20µl/sample, obtaining the following concentrations: buffer 1x, 200µM of each dNTPs, 0.5 µM of each primer, 3% DMSO, and 0.02 U/µl of Taq polymerase.

In addition, one positive control and two negative controls were used for each test (one internal, where the mix is prepared, and one external, where DNA samples are mounted). All products were ran in a 2% agarose gel, using EZ-Vision (AMRESCO®) dye. The power source was set at 100 volts for 40 minutes and the visualization was made in an ENDURO™ (Labnet) documentation system. All products positive for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma platys*, were sent for sequencing to MacroGen Inc., Seoul-Korea, sequences were edited with DNASTar, and phylogenetic analysis were made using the MEGA 6.1 program (12).

Serological test (SNAP 4Dx). For the serological tests, we used the SNAP 4Dx (IDEXX®) kit to detect the *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) antigen, antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. Serum samples stored at -20°C were left at room temperature for 30 minutes, and after that time had elapsed, we carried out the tests following manufacturer recommendations (13).

RESULTS

We drew a clinical sheet for each animal, indicating general data (sex, age, breed). Out of the 46 animals in the study, 20 (43%) were male, and 26 (57%) were females. There was no characterization for breed, since they were all mixes. According to dental record aging, they were all adults.

Comparison of the hematological analysis of the red blood, white blood, and platelet samples with reference values of 97 healthy dogs with ages between 1 and 6 treated in the Veterinary Hospital of Universidad de Antioquia Between years 2007 and 2009 showed no abnormalities in any of the individuals (14).

We found that all extracted DNA samples assessed through electrophoresis showed a good integrity, and spectrophotometry showed an average concentration

728 (5'CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT 3') que amplifican un segmento de 409-pb del gen *dsb* (9). Las condiciones de termociclado fueron de 98°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 98°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, una extensión final de 72°C por 5 minutos y 4°C hasta el momento de verificar el resultado de las reacciones en un gel.

Para *A. platys* se utilizaron los iniciadores pla-HS475F (5'AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA 3') y pla-HS1198R (5'CATAGTCTGAAGTGGAGGAC 3'), que amplifican un fragmento de 724-pb del gen *groEl*. Las condiciones de termociclado fueron 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos y 4°C hasta el momento de confirmar el resultado en una gel de Agarosa (10,11). Para ambas reacciones se usó el kit de PCR Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo®), que utiliza un volumen final de 20µl/muestra, obteniendo las siguientes concentraciones: buffer 1x, 200µM de cada uno de los dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los iniciadores, 3% de DMSO, y 0.02 U/µl de Taq polimerasa.

Adicionalmente, en cada ensayo se usó un control positivo y dos controles negativos (uno interno, donde se prepara el mix y otro externo, donde se montan las muestras de ADN). Todos los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2%, usando como intercalante EZ-Visión (AMRESCO®). La fuente de poder se programó a 100 voltios por 40 minutos y el revelado se hizo en un fotodocumentador ENDURO™ (Labnet). Todos los productos positivos a *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma platys*, fueron enviados a secuenciar en la empresa MacroGen Inc., Seul-Korea, las secuencias fueron editadas con el programa DNASTar y los análisis filogenéticos fueron realizados en el programa MEGA 6.1 (12).

Prueba serológica (SNAP 4Dx). Para las pruebas serológicas se utilizó el kit de SNAP 4Dx (IDEXX®) para la detección de Antígeno de *Dirofilaria immitis* (gusano del corazón canino), Anticuerpos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii*. Las muestras de suero almacenados a -20°C, se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos, pasado este tiempo se procedió a la realización de las pruebas según indicaciones del fabricante (13).

RESULTADOS

Se elaboró una ficha clínica para cada animal, indicando los datos generales (sexo, edad,

of 87 ng/ μ l and a 260-280 ratio averaging 1.75. The molecular tests for all 46 dogs showed three positive cases for *A. Platys* (two males and one female, subjects 7, 83 and 94); and five for *E. canis* (three females and two males, subjects 7, 16, 48, 62, and 63), accounting for 6.5% and 10.9% of the studies population, respectively (Table 1).

Out of the five products obtained through PCR for the *Ehrlichia dsd* gene, three were clear enough to be analyzed (subjects 7, 48, and 63). Identity and coverage results were analyzed in order to establish homologies with reference sequences. We then drew a phylogenetic tree with the Neighbor-Joining method, using a 1000 replication bootstrap and the P distance method to calculate evolutionary distance. The tree was rooted in its middle point and the results of this analysis show that the sequences found correspond to *E. canis*. With the results for the *groEL* gene, which are specific primers for *A. platys*, we were able to confirm these bacteria in one of the three obtained sequences (subject 7), since the other two results yielded very tenuous products and sequences had low quality (Figures 1 and 2).

The SNAP 4DX quick test showed four positive samples to the antigenic reaction: one female and one male identified with numbers 16 and 62 reacted to *Ehrlichia* spp.; two females, identified as 7 and 42 reacted to *Anaplasma* spp.; and one more female, number 82, was positive for both agents. In general, we obtained a 60.5% (3/46) positivity for each bacterial agent. As a special piece of data, one female (number 7), was positive for *Anaplasma* spp. In serological and molecular tests, also showed positive for *E. canis*, but only in PCR. On the other hand, the results for the rest of the tests, *D. immitis* and *B. burgdorferi*, were negative, as shown in Table 1.

raza). De los 46 animales ingresados al estudio 20 (43%) fueron machos y 26 (57%) hembras. No hubo caracterización de razas, dado que en su totalidad eran de diversos cruces. La edad por registro dental correspondió a ejemplares adultos.

Cuando se compararon los análisis hematológicos del cuadro de glóbulos rojos, blancos y plaquetas con los valores de referencia de 97 perros sanos entre 1 y 6 años de edad atendidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de Antioquia entre 2002 y 2009, no se evidenciaron anomalías en ninguno de los ejemplares (14).

Se observó que todas las muestras del ADN extraído evaluadas por electroforesis presentaba una buena integridad y por espectrofotometría se obtuvo una concentración promedio de 87 ng/ μ l y una relación 260-280 en promedio de 1.75. Al realizar las pruebas moleculares de los 46 caninos, tres fueron positivos para *A. Platys* (dos machos y una hembra, individuos 7, 83 y 94); y cinco para *E. canis* (tres hembras y dos machos, individuos 7, 16, 48, 62 y 63), representando el 6.5% y 10.9% de la población del estudio respectivamente (Tabla 1).

De los cinco productos obtenidos por PCR para el gen *dsd* de *Ehrlichia*, tres fueron los suficientemente claros como para ser analizados (individuos 7, 48 y 63). Los resultados de identidad y cobertura fueron analizados con el fin de establecer homologías con secuencias de referencia. Se realizó un árbol filogenético por el método Neighbor-Joining usando un bootstrap de 1000 réplicas y el método de la distancia de P para el cálculo de la distancia evolutiva. El árbol fue enraizado en el punto medio y el resultado de este análisis muestra que las secuencias encontradas corresponden a *E. canis*. Con los

Table 1. Serological and molecular results for *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma platys* in subjects resulting positive in at least one of the tests.

Subject	Sex*	SNAP 4Dx Serology		PCR	
		<i>A. Phagocytophilum/platys</i> †F 6.5% (3/46)	<i>E. canis/ewingii</i> F 6.5% (3/46)	Gen <i>groEL</i> F 6.5% (3/46)	Gen <i>Dsb</i> F 10.9% (5/46)
7	H	+	-	+	+
16	H	-	+	-	+
42	H	+	-	-	-
48	H	-	-	-	+
62	M	-	+	-	+
63	M	-	-	-	+
82	H	+	+	-	-
83	M	-	-	+	-
94	M	-	-	+	-

* M (Male) H (Female). PCR End Point Polymerase Chain Reaction. (-) Negative (+) Positive for the diagnostic test. † F, Frequency.

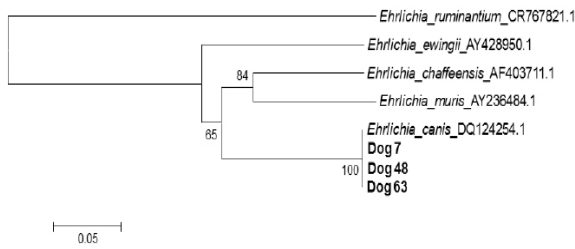


Figure 1. Phylogenetic tree drawn through the Neighbor-Joining method with the *dsb* gene (290 nucleotides) of *Ehrlichia*. Using a 1000 replication bootstrap and the P distance method to calculate evolutionary distance. Analysis was made in the MEGA 6.1 program and the tree is rooted in the middle.

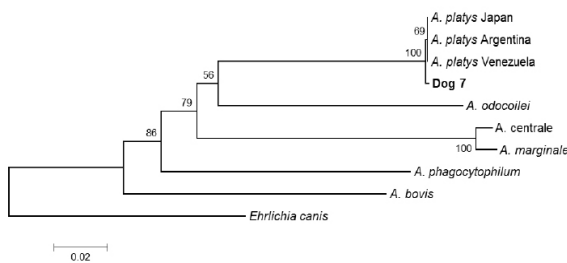


Figure 2 Phylogenetic tree drawn through the Neighbor-Joining method with the *groEL* gene (577 nucleotides) of *Anaplasma*. Using a 1000 replication bootstrap and the P distance method to calculate evolutionary distance. Analysis was made in the MEGA 6.1 program and the tree is rooted with *E. canis*.

When comparing both types of tests, SNAP and PCR, we found that two subjects presented antibodies and sequences for *E. canis*, three more were positive through the molecular test but still had no antibodies detectable by the serological test and one more was positive in the serological test but had no detectable bacteria sequences through the molecular blood test. In the case of *A. platys*, the results were the following: one positive subject in both tests, two subjects were positive in the molecular test but negative in the serological test, and finally two more showed antibodies but were negative in the molecular test (Table 2).

Table 2. Description through SNAP 4Dx serology and End Point PCR.

Pathogen	SNAP+/ PCR+	SNAP+/PCR-	SNAP-/PCR+
<i>E. canis</i>	2	1	3
<i>A. platys</i>	1	2	2

resultados del gen *groEL* que son iniciadores específicos para *A. platys*, se logró confirmar esta bacteria en una de las tres secuencias obtenidas (individuo 7), ya que los otros dos resultados dieron productos muy tenues y las secuencias fueron de baja calidad (Figuras 1 y 2).

Por medio de la prueba rápida SNAP 4DX, cinco muestras positivas a la reacción antigénica: una hembra y un macho identificados con la numeración 16 y 62 reaccionaron contra *Ehrlichia* spp.; dos hembras identificadas como 7 y 42 fueron reactivas para *Anaplasma* spp.; y una hembra más identificada como 82, fue positiva para ambos agentes. En general se obtuvo un 6.5% (3/46) de positividad para cada uno de los géneros bacterianos. Como dato particular en los resultados, una hembra (identificada con el # 7) fue positiva a *Anaplasma* spp. serológica y molecularmente, y fue también positiva a *E. canis*, pero solo por PCR. Por otro lado, los resultados para las demás pruebas, *D. immitis* y *B. burgdorferi*, fueron negativos, como se puede apreciar en la tabla 1.

Al comparar los dos tipos de pruebas, SNAP y PCR, se encontró que dos individuos presentaban anticuerpos y secuencias para *E. canis*, tres más fueron positivos por prueba molecular pero aún no tenían anticuerpos detectables por la prueba serológica y uno más fue positivo por la prueba serológica pero no tenía secuencias de la bacteria detectables por la prueba molecular en sangre. En el caso de *A. platys* el resultado fue, un individuo positivo a las dos pruebas, dos individuos fueron positivos a la prueba molecular pero negativos a la serológica y por último dos más presentaban anticuerpos pero fueron negativos a la prueba molecular (Tabla 2).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados moleculares obtenidos con este estudio, se observó una frecuencia de infección del 11% de *E. canis*, en animales abandonados y rescatados en las zonas peri-urbanas o rurales. Estos resultados son inferiores a los encontrados en un trabajo realizado en el departamento del Valle del Cauca, donde se registró un porcentaje de positividad del 54% de *E. canis*, esto se debe a que el estudio fue llevado a cabo en una zona más cálida, donde las poblaciones de garrapatas tienden a ser mayores y la metodología utilizada más sensible (PCR anidada)(15).

Los resultados de positividad a *Ehrlichia* spp. por SNAP 4Dx (6.5%); fueron más bajos que los obtenidos en Ibagué (departamento del Tolima,

DISCUSSION

According to the molecular results in this study, we found an 11% infection frequency of *E. canis* in animals that were abandoned and rescued in peri-urban or rural areas. These results are lower than those found in a work carried out in the Department of Valle del Cauca, which showed a 54% of positive cases of *E. canis*, probably because such study was carried out in a warmer area, where tick populations are usually greater and the methodology used is more sensitive (nested PCR) (15).

Positive results for *Ehrlichia* spp. through SNAP 4Dx (6.5%) were lower than those obtained in Ibagué (department of Tolima, Colombia), which showed an approximate 32% (16). Just as in the previous case, the study in Ibagué used a different serological test (indirect immunofluorescence or IFI), which demands higher skills to differentiate unspecific reactivity.

When comparing the molecular and serological results of this study, we found that out of the six positive subjects (Table 2), only two were congruent with the tests, and since they were clinically healthy animals, we may infer that the canine subjects were in a subacute stage of the infection. Three more animals were positive through PCR and negative to the serological test; these animals were probably in the initial stage of the infection, and this result highlights the importance of having an additional tool to diagnose the acute stage. Finally, one dog was positive in the serological test and negative in the molecular test, probably due to a past infection or for being in a chronic stage, where the bacteria settles in the spleen or bone marrow, but not in the bloodstream (17). Similar data was found in Wong et al (18) in 2011.

For *A. platys* we found a 6.5% molecular detection and 6.5% serological positivity. Asking the *Ehrlichia* detection test, we found one subject that was positive in both tests, two subjects positive only on the serological test, and two more individuals positive only for PCR. The result matches the previous studies made in canine subjects that also detected *A. platys* in Colombia (6); the results in the studies are highly relevant for veterinarians since their differential diagnosis should consider this agent.

On the other hand, when we analyzed the hematological insults, we found that the white cell line and the platelet line showed no abnormal values in positive subjects. During the study, the dogs showed an apparent good health condition, suggesting that despite the presence of Anaplasmataceae bacteria in positive subjects, bacterial loads were not high enough to produce some clinical condition. Finally, we highlight that molecular tests are a mystery tool to diagnose this type of infections of Anaplasmataceae microorganisms.

Colombia), donde se encontró un porcentaje aproximado del 32% (16). Al igual que en el caso anterior, en Ibagué se usó una prueba serológica diferente (inmunofluorescencia indirecta o IFI), la cual requiere una mayor destreza para diferenciar la reactividad inespecífica.

Al comparar los resultados moleculares y serológicos de este estudio, se encontró que de los seis individuos positivos (Tabla 2) solo dos fueron concordantes por las dos pruebas, y que por tratarse de animales clínicamente sanos se infiere que los ejemplares caninos estaban en una fase subaguda de la infección. Tres animales más fueron positivos por PCR y negativos a la prueba serológica, estos animales posiblemente estaban en una fase inicial de la infección, y este resultado resalta la importancia de contar con una herramienta adicional para el diagnóstico de la fase aguda. Finalmente, un perro fue positivo a la prueba serológica y negativo a la molecular, este hallazgo pudo haberse dado posiblemente por una infección en el pasado o por estar infectado en fase crónica, donde la bacteria suele estar en el bazo o medula ósea, mas no en circulación (17) Datos similares fueron encontrados en el trabajo de Wong et al (18) en el 2011.

Para *A. platys* se tuvo una detección molecular del 6.5% y positividad serológica del 6.5%. Similar al estudio de detección de *Ehrlichia*, se encontró un individuo positivo a las dos pruebas, dos individuos positivos sólo a la prueba serológica y dos individuos más positivos solo por PCR. Este resultado concuerda con los estudios previamente realizados en ejemplares caninos en donde también fue detectado *A. platys* en Colombia (6), los resultados obtenidos en estos estudios son altamente relevantes para los médicos veterinarios, debido a que dentro de sus diagnósticos diferenciales se debería tener en cuenta este agente.

De otro lado, al analizar los resultados hematológicos, se determinó que tanto en la línea celular blanca como en las plaquetas no se evidenciaron valores anormales en los ejemplares positivos. Durante el estudio los perros estudiados presentaron un aparente buen estado de salud, esto sugiere que a pesar de la presencia de bacterias de la familia Anaplasmataceae en los animales positivos las cargas bacterianas no fueron lo suficientemente altas para ocasionar algún tipo de trastorno clínico. Finalmente se resalta que las técnicas moleculares son una herramienta necesaria en el diagnóstico de este tipo de infecciones de microorganismos de la familia Anaplasmataceae.

Acknowledgments

To COLCIENCIAS for financing the “Programa nacional para la investigación y desarrollo de productos veterinarios. Nanotecnología farmacéutica: una estrategia de innovación (National program for researching and developing veterinary products. Pharmaceutical nanotechnology: an innovation strategy)” project code 127556238833, in call 562–2012 “banco de proyectos I+D+I, programa nacional de biotecnología (I+D+I Project Bank, National Biotechnology Program)” with the support of Corporación Universitaria Lasallista; and to GENTECH as co-financiers. To the Hogar de Alicia animal welfare center, veterinarian Victor Molina, and all the members of the Centauro group, and GIVET for their advice on lab essay setup.

Agradecimientos

A COLCIENCIAS por la financiación del proyecto “Programa nacional para la investigación y desarrollo de productos veterinarios. Nanotecnología farmacéutica: una estrategia de innovación” código 127556238833, en la convocatoria 562–2012 “banco de proyectos I+D+I, programa nacional de biotecnología” con el apoyo de La Corporación Universitaria Lasallista y a GENTECH como cofinanciadores. Al centro de bienestar animal Hogar de Alicia, al médico veterinario Victor Molina, y a los integrantes del grupo Centauro y GIVET por la asesoría en los montajes de los ensayos de laboratorio.

REFERENCIAS

- Hidrón BA, Muñoz RF, Vega MJ. Primer caso de ehrlichiosis monocítica humana reportado en Colombia. *Infectio* 2014; 18(4):162-166.
- Openshaw JJ, Swerdlow DL. Human ehrlichiosis: clinical and ecological challenges. *South Med J* 2007; 100(8):769–70.
- Little SE. Ehrlichiosis. *Arthropod Borne Diseases*. Springer International Publishing; Switzerland: 2017.
- Dolz G, Ábrego L, Romero LE, Campos-Calderón L, Bouza-Mora L, Jiménez-Rocha AE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in Costa Rica. *Acta Med Costarric* 2013; 55(Supl).
- Nair ADS, Cheng C, Ganta CK, Sanderson MW, Alleman R, Munderloh UG, et al. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with Ehrlichia canis, E. chaffeensis, Anaplasma platys and A. phagocytophilum. *PLoS One* 2016; 11(2):1-21.
- Vargas-Hernandez G, André MR, Cendales DM, Sousa KC, Gonçalves MD, Rondelli LR, et al. Molecular detection of Anaplasma species in dogs in Colombia. *Braz J Vet Parasitol* 2016; 25(4):459–64.
- Miranda J, Mattar S. Molecular detection of Anaplasma sp. and ehrlichia sp. in ticks collected in domestical animals, Colombia. *Trop Biomed* 2015; 32(4):726–35.
- Lina María CY, Leonardo Alberto RO, Jaiberth Antonio CA. Seroprevalencia de Ehrlichia canis en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Rev Med Vet* 2015; (29):51–62.
- Labruna MB, McBride JW, Camargo LMA, Aguiar DM, Yabsley MJ, Davidson WR, et al. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet Parasitol* 2007; 143(2):189–95.
- Inokuma H, Fujii K, Okuda M, Onishi T, Beaufile J, Raoult D, et al. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9(5):1132–1136..
- Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. Infection with Ehrlichia canis and Anaplasma platys (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6(6):724–9.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8):1596–9.
- O’Connor TP. SNAP Assay Technology. *Top Companion Anim Med* 2015; 30(4):132–8.

14. Bossa-Miranda MA, Valencia-Celis V del C, Carvajal-Giraldo BA, Ríos-Osorio LA. Automated hemogram values for healthy dogs aged 1 to 6 years attended at the Veterinary Hospital - Universidad de Antioquia (Colombia), 2002-2009. *Rev Colomb Ciencias Pecu.* 2012; 25(3):409-16.
15. Rojas A, Rueda A, Díaz D, Mesa NC, Benavides J, Imbachi K, et al. Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Vet Zootec* 2013; 7(1):37-48.
16. Salazar H, Buriticá EF, Echeverry DF, Barbosa IX. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). *Rev Colomb Cienc Anim* 2014; 7(1):56-63.
17. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Vet J* 2011; 187(3):292-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
18. Wong SSY, Teng JLL, Poon RWS, Choi GKY, Chan K-H, Yeung ML, et al. Comparative Evaluation of a Point-of-Care Immunochromatographic Test SNAP 4Dx with Molecular Detection Tests for Vector-Borne Canine Pathogens in Hong Kong. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(9):1269-77.