

ORIGINAL

Infection by *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* sp. in dogs attended in veterinary clinics, Barranquilla, Colombia

Infección por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* sp. en caninos atendidos en clínicas veterinarias en Barranquilla, Colombia

María Badillo-Viloria^{1,2*} M.Sc, Anderson Díaz-Perez^{1,2} Ph.D,
Christian Orozco-Sánchez^{1,3} M.Sc, Rodrigo de Laval-Galvis⁴ Esp.

¹Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas. Barranquilla, Colombia. ²Corporación Universitaria Rafael Núñez, Facultad Ciencias de la Salud. Colombia. ³Corporación Universitaria de Ciencias Empresariales, Educación y Salud –CORSALUD, Grupo de Investigación en Ciencias Empresariales, Educación y Salud. Barranquilla, Colombia. ⁴Clínica veterinaria Máster Vet. Barranquilla, Colombia.
*Correspondence: mbadillo3@unisimonbolivar.edu.co

Received: August 2016; Accepted: March 2017.

ABSTRACT.

Objective. Determine the prevalence of infection by *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* sp. and its correlation with epidemiological and laboratory aspects, in dogs treated in veterinary clinics in Barranquilla, Colombia. **Materials and methods.** Retrospective, descriptive cross-sectional study. The data was obtained between the months from January to August 2015. 184 dogs that clinically presented the infection with these agents were studied. Criteria for positivity were immunochromatography kit and blood smear, epidemiological and laboratory data. **Results.** Global prevalence was ascertained as 34% (63 dogs), 28% (52/184 dogs) for *E. canis* and 6% (11/184 dogs) to *Anaplasma* sp. Hemogram of dogs infected with both bacteria were hematocrit decreased, they also showed leukopenia and thrombocytopenia. **Conclusions.** Findings reported in this study show a high prevalence and endemicity of *E. canis* y *Anaplasma* sp. in Barranquilla when compared with other colombian regions. Hemogram findings showed to be relevant to diagnostic and prognostic of these infectious diseases.

Key words: *Anaplasmataceae*, Hematology, Prevalence, Tick-borne diseases, Zoonoses (Fuente: CAB).

RESUMEN

Objetivo. Determinar la prevalencia de la infección por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* sp. y su correlación con aspectos epidemiológicos y de laboratorio, en caninos atendidos en clínicas veterinarias de Barranquilla, Colombia. **Materiales y Métodos.** Estudio de tipo descriptivo, retrospectivo de corte transversal. Los datos se obtuvieron en los meses de enero a agosto de 2015. Se analizaron 184 caninos compatibles clínicamente con infección por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* sp., se utilizaron los criterios de positividad de un kit comercial de inmunocromatografía y el extendido de sangre periférica, además se recolectaron datos epidemiológicos y de laboratorio. **Resultados.** 63 caninos (34%) fue la prevalencia global de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* sp., 52/184 (28%) caninos con *E. canis* y 11/184 (6%) con *Anaplasma* sp. El hemograma de los pacientes caninos positivos con *E. canis* y *Anaplasma* sp., presentaron disminución del hematocrito, leucopenia y trombocitopenia. **Conclusiones.** Los hallazgos encontrados a partir de este estudio muestran una alta prevalencia y endemicidad de *E. canis* y *Anaplasma* sp. en Barranquilla en contraste con otras regiones de Colombia. Los datos del hemograma demostraron ser relevantes en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades.

Palabras clave: *Anaplasmataceae*, Enfermedades Transmitidas por garrapatas, Hematología, Prevalencia, Zoonosis (Fuente: DeSC)

INTRODUCTION

Ehrlichia and *Anaplasma* belong to the subgroup α -Proteobacteria, Rickettsiales order, Anaplasmataceae family (1), are obligate intracellular gram-negative bacteria, replicate in cytoplasmic vacuoles derived from the host cell of mammalian vertebrates mainly in leukocytes and platelets (2) and arthropods vectors such as ticks (3). These bacteria produce emerging zoonotic diseases that infect mainly dogs and cattle, horses, human beings (2), also it has been reported in felines (4). They are multisystemic and characterized by nonspecific clinical signs and hematological alterations in dogs (5) and in human beings (6). They are diagnosed by different laboratory techniques that include indirect (IFI, ELISA) and direct tests (eg Blood Frotis and Polymerase Chain Reaction-PCR) (5,7).

These vector-borne diseases (VBD) have increased markedly in dogs and human beings and are widely distributed worldwide (8), frequently present in tropical and subtropical areas (9), where proliferate ticks as *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes* spp. which have been identified in South America (10) and whose reservoirs could be wild animals, cattle and pets (8).

The occurrence of VBD can be influenced by several factors such as climate change, and anthropogenic factors such as urbanization, deforestation, demographic changes, economic crisis, displacement of people and animals (8,11). The exploitation of natural resources and loss of biodiversity affect the transmission cycle of ticks, which leads to a variation in vectorial competition (8,11).

Because of its geographical location, the Colombian Caribbean brings together all the characteristics and factors mentioned above that favor the incidence of these infections. This raises a challenge for public health, human and veterinary medicine, differential diagnosis with other microorganisms and the occurrence of coinfections that aggravate the clinical profile (12-14), especially in coastal areas such as Barranquilla, where higher prevalence of *Ehrlichia* sp. has been reported (9,15) in comparison to other regions of the country (5,16-20)

Therefore, it is essential to monitor the spread and increase of these agents in endemic areas, to contrast prospective and retrospective studies, and characterize epidemiological, clinical and laboratory aspects in all regions of the country. Thus, the objective of this study was to determine the prevalence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* sp. and its correlation with epidemiological and

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia y *Anaplasma* pertenecen al subgrupo α -Proteobacteria, orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (1), son bacterias gramnegativas intracelulares obligadas. Se replican en vacuolas citoplasmáticas derivadas de la célula hospedera de vertebrados mamíferos principalmente en leucocitos y plaquetas (2) y artrópodos vectores como garrapatas (3). Producen enfermedades zoonóticas emergentes que infectan principalmente caninos y bovinos, además, caballos y humanos (2), también se han reportado en felinos (4). Son infecciones multisistémicas y se caracterizan por signos clínicos inespecíficos y alteraciones hematológicas en caninos (5) y en humanos (6). Pueden ser diagnosticadas por diferentes técnicas de laboratorio que incluyen pruebas indirectas (IFI, ELISA) y directas (Ej. frotis sanguíneo y reacción en cadena de la polimerasa-PCR) (5,7).

Estas enfermedades son transmitidas por vectores (ETV) y se han incrementado notablemente en perros y humanos con una amplia distribución mundial (8), se presentan frecuentemente en zonas tropicales y subtropicales (9), en donde proliferan las garrapatas vectores; *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* spp., identificadas en América del Sur (10) y cuyos reservorios pueden ser animales silvestres, bovinos y animales de compañía (8).

La aparición de ETV puede ser influenciada por varios factores como el cambio climático y factores antropogénicos como; urbanización, deforestación, cambios demográficos, la crisis económica, desplazamientos de personas y animales (8,11). La explotación de los recursos naturales y pérdida de la biodiversidad afectan el ciclo de transmisión de las garrapatas, lo que conlleva a una variación en la competencia vectorial (8,11).

El Caribe colombiano por su ubicación geográfica, reúne todas las características y factores anteriormente descritos que favorecen la presentación de estas infecciones. Esto plantea un reto para la salud pública, humana y animal, en el diagnóstico diferencial con otros microorganismos y la presentación de coinfecciones que agravan el cuadro clínico (12-14), principalmente en zonas costeras como Barranquilla, en las que se ha reportado mayor prevalencia de *Ehrlichia* sp. (9,15) que en otras regiones del país (5,16-20).

Por tanto es primordial la vigilancia de la propagación y el incremento de estos agentes en zonas endémicas, contrastar estudios

laboratory factors in dogs attended in veterinary clinics. Barranquilla, Colombia.

Materials and methods.

Type of study. Descriptive, retrospective of cross-sectional study.

Collection of information. The data were collected between January and August 2015, from secondary sources of information, clinical profiles and data from veterinary laboratories of nine veterinary clinics in the city of Barranquilla, Atlántico, to which 184 dogs were attended, clinically compatible with infection by *Ehrlichia* and *Anaplasma*; the data of results of positivity of the techniques extended peripheral blood for the observation inclusions in the cytoplasm for *Ehrlichia* sp. and *Anaplasma* sp., and a commercial kit immunochromatographic for the qualitative detection of antibodies to *Ehrlichia canis*, epidemiological data such as sex, age, race, and blood count data obtained by conventional techniques such as microhematocrit and plaque counts were also collected.

Analysis of data. Data were analyzed using SPSS 21® and Statgraphics Centurion Plus® to perform Two-way ANOVA analysis with a p value ≤ 0.05 . A descriptive analysis was utilized, determining central tendency measures and dispersion measures, in the case of the continuous variables; for categorical variables, proportions were shown. To measure the correlation between epidemiological and laboratory variables with the positivity probability of the studied infections, with a confidence level of 95% and a p value ≤ 0.05 , correlation coefficients were generated by Pearson.

Ethical aspects. The project was evaluated by the Simon Bolivar University Microbiology program ethics and research committee, defining the study as risk free according to article 87 of resolution 8430/93 of the Ministry of Health of Colombia and law 84 of 1993 according to the Congress of Colombia, because, the data were taken from the stories clinics of the dogs.

RESULTS

E. canis and *Anaplasma* sp. overall prevalence was 34% (63/184 dogs), the seropositivity for *E. canis* was 28% (52 dogs), by means of the commercial kit immunochromatographic (Table 1). Obtained results from the extended peripheral blood demonstrated a prevalence of 6% (11 dogs) for *Anaplasma* sp. (Table 1) and in 2% (4 dogs) a coinfection with these agents was evidenced from both techniques.

prospectivos y retrospectivos y caracterización de los aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio en todas las regiones del país. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de la infección por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* sp. y correlacionarlos con los factores epidemiológicos y de laboratorio, en caninos de Barranquilla, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. Estudio descriptivo, retrospectivo de corte transversal.

Recolección de la información. Los datos fueron tomados de Enero a Agosto de 2015, a partir de fuentes de información secundarias; historias clínicas y datos de laboratorios veterinarios de nueve clínicas veterinarias en la ciudad de Barranquilla, Atlántico, a los cuales ingresaron 184 caninos, compatibles clínicamente con infección por *Ehrlichia* y *Anaplasma*, se utilizaron los datos de los resultados de las técnicas de extendido de sangre periférica, para la observación de inclusiones citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp. y *Anaplasma* sp. y un kit comercial inmunochromatográfico para la detección cualitativa de anticuerpos de *Ehrlichia canis*. Se recolectaron además, datos epidemiológicos como sexo, edad, raza y datos del hemograma obtenidos por técnicas convencionales, como microhematocrito y recuento en placa.

Análisis de datos. Los datos se analizaron por medio del programa SPSS 21® y Statgraphics Centurion Plus® para realizar el análisis ANOVA bivariado con un valor ≤ 0.05 . Se empleó un análisis descriptivo, determinándose las medidas de tendencia central y dispersión, en el caso de las variables continuas; para las variables de tipo categórico, se mostraron proporciones. Para medir la correlación entre las variables epidemiológicas y de laboratorio con la probabilidad de positividad de las infecciones estudiadas, con un nivel de confianza del 95% y un valor de $p \leq 0.05$ se generaron los coeficientes de correlación mediante de Pearson.

Aspectos éticos. El proyecto fue evaluado por el comité de ética e investigación del programa de Microbiología de la Universidad Simón Bolívar, determinando el estudio como sin riesgo según el artículo 87 de la resolución 8430/93 del Ministerio de Salud de Colombia y la ley 84 de 1993 según el congreso de Colombia, ya que los datos fueron tomados de las historias clínicas de los caninos.

Epidemiological characteristics. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* sp. presented a mean age of 52 months (range, 1 - 192 months), the highest number of positive 43% (27 dogs) were between 13 to 84 months. 63% of dogs with *E. canis* were male, on contrary to 64% of dogs with *Anaplasma* sp. were females. On the other hand, the highest number of positive dogs occurred in the medium and small breeds (Table 2), the 16% were of the race French Poodle, followed by Labrador 11% and YorkShire Terrier 10%. There was no statistically significant association between the epidemiological characteristics and the test results used for the diagnosis infection by these two agents.

Laboratory findings. The most significant finds in study positive dogs were the hematocrit decrease ($p \leq 0.05$) (Table 3) (mean = $37 \pm 7.6\%$), mainly in 48% (13/27 dogs) were between 13 to 84 months, 37% (11/27 dogs) were medium breed and 60% (15/33 dogs) were males; the lowest mean values were presented in dogs 0 to 12 and 13 to 84 months ($37 \pm 8\%$) and in the large breeds (34.2 ± 6.4 g/dL); Hemoglobin and hematocrit decreased by 45% on dogs with *Anaplasma* sp. (Table 3).

Table 2. Epidemiological data on dogs with Ehrlichia canis and Anaplasma sp. infection

Variable	Number of positive dogs (%) with <i>Ehrlichia canis</i> infection n=52	Number of positive dogs (%) with <i>Anaplasma</i> sp. infection n=11
Age		
(0 a 12 months)	11 (21)	1 (9)
(13 a 84 months)	23 (44)	4 (36)
(>84 months)	5 (10)	2 (18)
NI	13 (25)	4 (36)
Sex		
Female	18 (35)	7 (64)
Male	33 (63)	3 (27)
NI	1 (2)	1 (9)
Breed		
Large (Over 40 Kg)	12 (23)	2 (18)
Medium (20 to 40 Kg)	19 (37)	4 (37)
Small (0 to 20 Kg)	18 (34)	4 (36)
NI	3 (6)	1 (9)

NI: Not identified

Table 1. Diagnosis of infection by Ehrlichia canis and Anaplasma sp. in dogs treated at veterinary clinics in Barranquilla.

Technique	Number of positive dogs for <i>Ehrlichia canis</i> (%)	Number of positive dogs for <i>Anaplasma</i> sp. (%)	Total
Immunochromatography (comercial test)	50 (27)	*	50(27)
Blood smear	2(1)	11(6%)	13(7)
Total positives	52 (28)	11(6%)	63(34)

*Was not performed immunochromatography for *Anaplasma* sp.

RESULTADOS

Se determinó la prevalencia global para *E. canis* y *Anaplasma* sp. en 34% (63/184) caninos, la seropositividad en el caso de *E. canis* fue del 28% (52 caninos), por medio de prueba comercial inmunocromatografica (Tabla 1). Los resultados obtenidos a partir del extendido de sangre periférica demostraron una prevalencia de 6% (11 caninos) para *Anaplasma* sp. (Tabla 1) y en 2% (4 caninos) se evidenció una coinfección con estos agentes a partir de ambas técnicas.

Características epidemiológicas. La infección por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* sp. se presentó con una media en la edad de 52 meses (rango, 1-192), 27(43%) de caninos positivos estuvieron entre 13 a 84 meses. El 63% de los caninos con *E. canis* fueron machos, en contraste, al 64% de los caninos con *Anaplasma* sp. fueron hembras. Por otra parte el mayor número de caninos positivos se presentaron en las razas medianas y pequeñas, el 16% fueron de la raza French Poodle, seguido del Labrador 11% y el York Shire Terrier 10% (Tabla 2). No hubo ninguna asociación estadísticamente significativa entre las características epidemiológicas con los resultados de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la infección por estos dos agentes.

Hallazgos de laboratorio. Los hallazgos más significativos en los caninos positivos fueron la disminución del hematocrito ($p \leq 0.05$) (media= $37 \pm 7.6\%$)(Tabla 3), la mayoría 48% en (13/27) caninos, los cuales estuvieron entre 13 a 84 meses, el 37% (11/27) eran de raza mediana y 60% (15/33) caninos eran machos. Los valores medios más bajos se presentaron por igual en los caninos de 0 a 12 y de 13 a 84 meses ($37 \pm 8\%$) y en los de raza grande (34.2 ± 6.4 g/dL); la hemoglobina y el hemotocrito disminuyeron en un 45% de caninos con *Anaplasma* sp. (Tabla 3). (21).

Thrombocytopenia was present in 44% dogs, (mean = $202 \pm 54 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$); 48% of these were positive dogs for *E. canis* ($p \leq 0.05$) (Table 3), mainly in medium breed 48% (11/23 dogs) and with age of 13 to 84 months 37% (11/27 dogs), the lowest mean values were found in dogs of less than 12 months ($184 \pm 43 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$) and in large breed dogs ($185 \pm 48 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$), as well as positive dogs for *E. canis* ($194 \pm 46 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$).

Furthermore, 36% of dogs positive for *E. canis* showed leucopenia ($p \leq 0.05$) (Table 3), with the lowest mean values ($5.3 \pm 3.0 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$) in dogs under 12 months, who presented thrombocytopenia as well. The leukocytosis was only present in two dogs who presented co-infection by both agents. Lymphopenia was higher in dogs positive for *E. canis* in contrast to none for *Anaplasma* sp. ($p = 0.05$) (Table 3), with the lowest mean values ($1.2 \pm 10^3 \text{ xmm}^3$) in dogs under 12 months, only four dogs with *E. canis* showed lymphocytosis. The decrease in neutrophils was only observed in 13% dogs with *E. canis*. Pancytopenia was presented mainly in dogs with *E. canis* 11.5%. Total proteins were increased mainly in dogs positive for *E. canis* 38% (20 dogs) (Table 3).

Seguidamente la trombocitopenia se presentó en un 44% caninos, (media= $202 \pm 54 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$); el 48% de estos eran caninos positivos para *E. canis* ($p \leq 0.05$) (Tabla 3), principalmente en caninos de raza mediana 48% (11/23) caninos y con edad de 13 a 84 meses 37% (11/27) caninos, los valores medios más bajos se presentaron en los caninos menores de 12 meses ($184 \pm 43 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$) y en los de raza grande ($185 \pm 48 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$), así como los caninos positivos para *E. canis* ($194 \pm 46 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$).

Por su parte el 36% de los caninos positivos para *E. canis* revelaron leucopenia ($p \leq 0.05$) (Tabla 3), presentándose los valores medios más bajos ($5.3 \pm 3.0 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$) en caninos menores de 12 meses, los cuales a su vez presentaron trombocitopenia. La leucocitosis solo se presentó en dos caninos que mostraron coinfección por ambos agentes. La linfopenia fue mayor en los caninos positivos para *E. canis* en contraste con ninguno para *Anaplasma* sp. ($p \leq 0.05$) (Tabla 3), con los valores medios más bajos ($1.2 \pm 9 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$) en caninos menores de 12 meses, solo cuatro caninos con *E. canis* mostraron linfocitosis. La disminución de los neutrofilos solo se evidenció en el 13% de caninos con *E. canis*. Pancitopenia se presentó mayoritariamente en los caninos con *E. canis* 11.5%. Las proteínas totales se aumentaron principalmente en caninos positivos para *E. canis* 38% (20 caninos) (Tabla 3).

Table 3. Laboratory results in dogs with infection by Ehrlichia canis and Anaplasma sp.

Variable	<i>Ehrlichia canis</i> in positive dogs n=52		<i>Anaplasma</i> sp in positive dogs n=11		Total Frequency (%) n=63
	Frequency (%)	p= Value	Frequency (%)	p= Value	
Hematocrito (%) Mean= 37 ± 7.6 ; Min=20; Max= 56	25 (48)	0.015	5 (45)	0.583	30(48)
Hemoglobin (g/dL) Mean= 12 ± 2.5 ; Min=7; Max=18	19 (36)	0.138	5 (45)	0.561	24(38)
Leukocytes (10^3 xmm^3) Mean= 7.4 ± 3.5 ; Min=1.0; Max=17.9	19 (36)	0.013	5(45)	0.285	24(38)
Neutrophils (10^3 xmm^3) Mean= 5.4 ± 2.4 ; Min=1.6; Max=11.9	7 (13)	0.189	2 (18)	0.183	9(14)
Lymphocytes (10^3 xmm^3) Mean= 1.9 ± 1.2 ; Min=0.4; Max=6.2	12 (23)	0.131	0(0)	0.050	12(19)
Platelets (10^3 xmm^3) Mean= 202 ± 54 ; Min=130; Max=410	25 (48)	0.017	3 (28)	0.592	28(44)
Total Proteins (g/dL) Mean= 7 ± 1.2 ; Min=4; Max=10	20 (38)	0.098	3 (28)	0.372	23(36)

Min: Minimum, Max: Maximum. * Correlation is significant at the 0.05 level.

DISCUSSION

In this study we evaluated the infection by *E. canis* and *Anaplasma* sp, in Barranquilla, the overall infection was detected in 34% (63 dogs), Higher prevalence in contrast to reported in Medellín, Antioquia 29.7% (52/175). However, the results found in this study were lower, contrasting with those reported in Cartagena, 80% (80/100 dogs), in Barranquilla, 8% (182/223 dogs) positive for *E. canis* and *A. phagocytophilum* (9) and 81.6% (178/218) canines positive for *E. canis* and *A. Platys* (15); All by detection of antibodies by serological tests.

Differences in sample size and studied canine populations were important factors in determining the prevalence of these infections. In the present study, data were obtained from dogs with owners who visited veterinary clinics, while in the other studies data and samples were obtained from dogs that inhabit streets, shelters and that belong to the military service who present a higher prevalence for these infections in comparison with dogs with owners (9,15).

On the other hand, the prevalence found of *E. canis* 28%, differs with that reported in other regions; Showed to be higher than reported in Medellín 25% (9) and 24.8% (22); Similar to what was found in Ibagué, Tolima 31.6% (17); And lower than in other cities such as Bucaramanga, Norte de Santander 89.7%, Villavicencio, Meta 83.8%, Bogota, Cundinamarca 66% (18), Cali, Valle del Cauca 40.5% (19), and finally in the Caribbean region, Cartagena 79%, Barranquilla 82% (9) and 74.4% (15). As for the prevalence of *Ehrlichia* sp., found in this study was higher in contrast to Medellín 11.2% (5) and Florencia, Caquetá 22.4% (16), considering that these reports may contain any species, including *E. canis*, so the comparison with these studies was important.

The notable differences in frequencies reported in each region can be explained by two factors, among others a) influence of the climatic conditions of the regions studied, it has been demonstrated a higher prevalence in tropical wetlands and coastal mainly Barranquilla and Cartagena, conditions that favor the proliferation and the cycle of transmission of the vector (9) and b) the different techniques used for the confirmation of the infection, in Colombia the veterinary clinics have generally used ELISA, Immunochromatography and blood smear (21), although the highest prevalence rates have been determined by serological tests (15,18).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la infección por *E. canis* y *Anaplasma* sp, en Barranquilla, la infección global fue del 34% (63 caninos), prevalencia más alta en contraste con lo reportado en Medellín, Antioquia 29.7% (52/175). Sin embargo los resultados hallados en este estudio fueron más bajos, contrastandolos con los reportados en Cartagena, 80% (80/100) caninos, en Barranquilla, 81% (182/223) caninos positivos para *E. canis* y *A. phagocytophilum* (9) y 81.6% (178/218) caninos positivos para *E. canis* y *A. platys* (15); todos por detección de anticuerpos por pruebas serológicas.

Las diferencias en el tamaño de las muestras y las poblaciones de caninos estudiadas son factores importantes para determinar la prevalencia de estas infecciones, en el presente estudio se obtuvieron datos de perros con propietarios que acudieron a las clínicas veterinarias, mientras que en los otros estudios se obtuvieron datos y muestras de caninos que habitan en calles, refugios y que pertenecen al servicio militar, quienes han demostrado presentar mayor prevalencia para estas infecciones en comparación con los perros con propietarios (9,15).

Por otra parte, la prevalencia hallada de *E. canis* 28%, difiere con lo reportado en otras regiones; demostró ser mayor que lo reportado en Medellín 25% (9) y 24.8% (22); similar a lo hallado en Ibagué, Tolima 31.6% (17); y más baja que en otras ciudades como, Bucaramanga, Norte de Santander 89.7%, Villavicencio, Meta 83.8%, Bogotá, Cundinamarca 66% (18), Cali, Valle del Cauca 40.5% (19) y finalmente en la región Caribe, Cartagena 79%, Barranquilla 82% (9) y 74.4% (15). En cuanto a la prevalencia de *Ehrlichia* sp., lo hallado en este estudio fue más alto en contraste con lo informado en Medellín 11.2% (5) y Florencia, Caquetá 22.4% (16), esto teniendo en cuenta que estos reportes pueden encerrar a cualquier especie, incluyendo a *E. canis*, por lo que resultó importante la comparación con estos estudios.

Las notables diferencias en la frecuencias reportadas en cada región, pueden explicarse por dos factores entre otros; a) influencia de las condiciones climáticas de las regiones estudiadas, se ha demostrado una mayor prevalencia en zonas húmedas tropicales y principalmente costeras como Barranquilla y Cartagena, condiciones que favorecen la proliferación y el ciclo de transmisión del vector (9) y b) las diferentes técnicas utilizadas para

The wide panorama in the use of techniques for the *E. canis* diagnosis has its own limitations. Serological tests are only useful in the subclinical and/or chronic phase of the infection, which is unknown in this study; while the blood smear is useful in the acute phase, often asymptomatic, the low sensitivity in both natural (23) and experimental infections (24), and the low bacteraemia, make microscopic identification difficult (25); In contrast the technique of polymerase chain reaction (PCR), although more sensitive also has the limitation of throwing false negatives in the subclinical phase of the disease (18). Taken this into account and the different phases and variety of clinical manifestations, it entails to define several aspects in the diagnosis of this disease; History of tick infestation, endemicity of the region with the presence of other related VBD, clinical signs and hematological and biochemical alterations with the respective confirmation by molecular methods (7).

With respect to *Anaplasma*, few reports have been found in Colombia, most studies have been directed towards livestock animals. The prevalence of *Anaplasma* sp. 11%, was higher in contrast to what was reported in Bucaramanga 1.1% canines (23). Although the prevalence is low, the use of a microscopic technique that has been shown to be less sensitive, yields valuable data, taking into account that the prevalence reports in the country for commercial serological tests, Barranquilla 53.2% canine with *A. platys*, (15) and 40% canines with *A. phagocytophilum* (9), Cartagena 51% and Medellín 11% canines with *A. phagocytophilum* (9), could be limited to the low specificity or cross reactivity of some kits between Several species of *Anaplasma* and *Ehrlichia* (26).

E. canis and *Anaplasma* sp. coinfections have been reported mainly in the Caribbean region, between 40-49% of dogs studied in Cartagena and Barranquilla (9,15); these results were higher than those found in this study 6% (4/63). It has been suggested that these agents simultaneous presence may lead to more serious immunological and hematological effects (13,14).

As for the epidemiological characteristics, the mean age reported in this study (52 ± 41 , range, 1-192 months) is similar to that found in Medellín (62.2 ± 42.5 , range, 2 -216 months) (22), the age group with the highest dogs frequent with *E. canis* and *Anaplasma* sp. infection, 13-84 months, as reported in Florencia 89.8% (16), Medellín 55% (22) and Cali 30.7% (19). Significant statistical associations between seropositivity and age have been identified in

la confirmación de la infección, en Colombia las clínicas veterinarias generalmente han utilizado ELISA, Inmunocromatografía y frotis sanguíneo (22), aunque las mayores tasas de prevalencia han sido determinadas por pruebas serológicas (15,18).

El amplio panorama en el uso de técnicas para el diagnóstico de *E. canis* tiene sus limitaciones. Las pruebas serológicas, solo son útiles en la fase subclínica y/o crónica de la infección, la cual se desconoce en este estudio; mientras que el frotis sanguíneo es útil en fase aguda, muchas veces asintomáticas, la baja sensibilidad tanto en infecciones naturales (23) y experimentales (24), y la baja bacteriemia, hacen difícil la identificación microscópica (25); en contraste la PCR, aunque más sensible también puede arrojar falsos negativos en la fase subclínica de la enfermedad (18). Ante esto y las diferentes fases y variedad de manifestaciones clínicas, es importante definir varios aspectos en el diagnóstico de esta enfermedad como antecedentes de infestación por garrapatas, endemicidad de la región con presencia de otras ETV relacionadas, signos clínicos y alteraciones hematológicas y bioquímicas (7).

Con respecto a *Anaplasma*, se han encontrado pocos reportes en Colombia, la mayoría de estudios se han dirigido hacia animales de producción pecuaria. La prevalencia de *Anaplasma* sp. 11%, fue mayor comparada a lo reportado en Bucaramanga 1.1% caninos (23). A pesar de que la prevalencia es baja, por haberse utilizado una técnica microscópica, arroja datos valiosos, teniendo en cuenta los reportes de prevalencia por pruebas serológicas comerciales, Barranquilla 53.2% caninos con *A. platys*, (15) y 40% caninos con *A. phagocytophilum* (9), en Cartagena 51% y Medellín 11% caninos con *A. phagocytophilum* (9), podrían estar limitados a la baja especificidad o reactividad cruzada de algunos kits entre varias especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* (26).

Las coinfecciones por *E. canis* y *Anaplasma* sp. se han reportado principalmente en la región Caribe, entre el 40-49% de los caninos estudiados en Cartagena y Barranquilla (9,15). Estos resultados fueron mayores que los hallado en este estudio 6% (4/63) caninos (13,14).

En cuanto a las características epidemiológicas, la edad media reportada en este estudio (52 ± 41 ; rango, 1-192 meses) es similar a la hallada en Medellín (62.2 ± 42.5 ; rango, 2 -216 meses) (22), el grupo de edad que presentó la mayor frecuencia de caninos con infección por *E. canis* y *Anaplasma* sp., fueron los caninos de 13-84 meses, como ha sido reportado en Florencia 89.8% (16), Medellín

other studies (16,27). As reported, infection can be mainly associated in dogs older than one year in comparison with younger dogs, due to their immunological status, greater exposure to vectors and hosts and less care by their owners (16,28).

As for sex, there were discrepancies in the results, while males were the most susceptible to *E. canis* and females to *Anaplasma* sp. infections; similar findings were reported in Cali 34.7% (19) and Florencia 56% (16) with higher number of male dogs with *E. canis* and *Ehrlichia* sp. respectively; in contrast, in Ibagué (17) the frequency of females with *E. canis* was higher 34.3% and results with equal proportions for males 25.9% and females 24% were reported in Medellín (22); thus there is currently no evidence of clinical susceptibility of dog sex-related infections in the country.

Likewise, the prevalence of dogs with *Ehrlichia* sp. was higher in medium and small breeds, mainly French Poodle, Labrador and Yorkshire Terrier as reported in other studies (16,17,19); however, in Medellín there was no infection predisposition in the different breeds (22).

On the other hand, the most significant laboratory data ($P < 0.05$) were anemia, thrombocytopenia and leukopenia with lymphopenia, results which were similar to another study in dogs with experimental infections (24) and contrary to results reported in Ibagué in which no laboratory data was statistically significant (17).

Infection with *E. canis* showed more notorious haematological changes such as anemia and thrombocytopenia with respect to infection by *Anaplasma* sp; mean values of platelets in dogs with *E. canis* were below the normal value ($194 \pm 46 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$), as reported in other studies in experimental infections (14,24). Thrombocytopenia in *E. canis* infections has been associated with the development of antiplatelet antibodies, whereas in infections by *Anaplasma platys*, it occurs by direct destruction of platelets (14,24), therefore, it is presumed in this study, that *E. canis* prevalence is higher, by means of serological tests that detect IgG antibodies production in the disease subclinical or chronic phase, this prolongation of immune response would favor thrombocytopenia in these dogs, whereas the prevalence of *Anaplasma* sp was lower through blood smear, which probably indicates acute infection.

It is important to mention that the moderate decrease in platelets found in this study is

55% (22) y Cali 30.7% (19). En otros estudios se han identificado asociaciones estadísticas significativas entre la seropositividad y la edad (16,27). Según lo informado puede asociarse principalmente la infección en perros mayores de un año en comparación con los jóvenes, en razón de su estado inmunológico, mayor exposición a vectores y hospederos y el menor cuidado por parte de sus propietarios (16,28).

En cuanto al sexo, hubo discrepancia en los resultados, mientras los machos fueron los más susceptibles para *E. canis*, las hembras en las infecciones por *Anaplasma* sp., hallazgos similares en Cali 34.7% (19) y Florencia 56% (16) con mayor número de caninos machos con *E. canis* y *Ehrlichia* sp., respectivamente; contrariamente en Ibagué (17) la frecuencia de hembras con *E. canis* fue mayor 34.3% y resultados con iguales proporciones tanto para machos 25.9% y hembras 24% se reportó en Medellín (22); con base en hallazgos, no existe en la actualidad evidencia de susceptibilidad clínica de infecciones relacionadas con el sexo de los caninos en el país.

De igual forma la prevalencia de caninos con *Ehrlichia* sp., fue mayor en razas medianas y pequeñas, principalmente French Poodle, Labrador y Yorkshire Terrier como ha sido reportado en otros estudios (16-19); sin embargo, en Medellín no hubo predisposición de la infección en las diferentes razas (22).

Por otra parte, los datos de laboratorio más significativos ($p \leq 0.05$), fueron la anemia, trombocitopenia y leucopenia con linfopenia, resultados similares al estudio en perros con infecciones experimentales (24) y contrario a lo reportado en Ibagué en el que ningún dato de laboratorio fue estadísticamente significativo (17).

La infección por *E. canis* demostró cambios hematológicos más notorios como la anemia y la trombocitopenia con respecto a la infección por *Anaplasma* sp. Los valores medios de plaquetas en los caninos con *E. canis*, estuvieron por debajo del valor normal ($194 \pm 46 \cdot 10^3 \text{ xmm}^3$), tal como se ha reportado en otros estudios en infecciones experimentales (14,24). La trombocitopenia en infecciones por *E. canis* se ha asociado con el desarrollo de anticuerpos antiplaquetarios, mientras que en las infecciones por *Anaplasma platys*, se da por destrucción directa de plaquetas (14,24). Por lo anterior podría ser posible, que la mayor la prevalencia de *E. canis*, favorecería la trombocitopenia en caninos, mientras que

not confirmed for true thrombocytopenia, a pseudothrombocytopenia *in vitro* is not dismissed (7), partly because of the destruction and satellitism of blood samples, due to the delay with which they often come to the laboratory to be processed. Therefore, it is essential to correctly evaluate platelet values in these infections.

Pancytopenia was also present mainly in dogs with *E. canis* 11.5%, as reported in Cebu, Philippines 5.7% (29), this could aggravate the clinical profile in the chronic phase, due to cellular production failure in the bone marrow (30). Also, in dogs that presented co-infection, even when it was low, one dog developed pancytopenia, and reason why, it could not be ruled out the possibility of occurring in the other dogs, more complex hematological and clinical alterations as has been reported in other studies (14,23).

Although, the rest of variable were not significant, in the descriptive analysis, the most important epidemiological and laboratory characteristics, such as anemia, thrombocytopenia and leucopenia, were more frequent in dogs from 13 to 84 months and medium breeds. However, the lowest mean values for hematocrit ($37.6 \pm 8.3\%$), leukocytes ($5.3 \pm 3.0 \cdot 10^3 \times \text{mm}^3$) and platelets ($184 \pm 43 \cdot 10^3 \times \text{mm}^3$) were present in <12 months dogs.

In conclusion, this study findings corroborate the high prevalence and endemicity of these agents in the region and other areas of Colombia, this poses a challenge for human and veterinary public health and zoonoses centers, complicating the differential diagnosis and the probabilities of transmission to humans beings, mainly of occupational type and people in frequent contact with dogs.

Acknowledgments

The authors thank the participating veterinary clinics, the Laboratory of Veterinary Diagnosis of the Caribbean (LABVECA, Barranquilla, Colombia) and Lizeth Paola Mejía Mendoza, for their support and collaboration in collecting data and valuable contributions to this study.

la prevalencia de *Anaplasma* sp, fue menor por medio de frotis sanguíneo, lo que indica probablemente infección aguda.

La pancitopenia también se presentó mayoritariamente en los caninos con *E. canis* 11.5%, tal como se ha informado en Cebu, Philippines 5.7% (29), esto podría agravar el cuadro clínico en la fase crónica, debido al fallo en la producción celular en la médula ósea (30). Asimismo, en los caninos que presentaron coinfección, aun cuando fue baja, un canino de estos desarrolló pancitopenia, son razones por las cuales, no podría descartarse la posibilidad de presentarse en los otros caninos, alteraciones hematológicas y clínicas más complejas como ha sido informado en otros estudios (14,24).

Asimismo, aunque no hayan sido significativas el resto de variables, en el análisis descriptivo las características epidemiológicas y de laboratorio más importantes como anemia, trombocitopenia y leucopenia se presentó mayor frecuencia en caninos de 13 a 84 meses y de razas medianas. Sin embargo, los valores medios más bajos para hematocrito ($37.6 \pm 8.3\%$), leucocitos, ($5.3 \pm 3.0 \cdot 10^3 \times \text{mm}^3$) y plaquetas ($184 \pm 43 \cdot 10^3 \times \text{mm}^3$) se presentaron en caninos < de 12 meses.

En conclusión, los hallazgos encontrados a partir de este estudio corroboran la alta prevalencia y endemicidad de estos agentes en la región y otras zonas de Colombia, esto plantea un reto para la salud pública humana y veterinaria, complicando el diagnóstico diferencial y las probabilidades de transmisión en humanos, principalmente de tipo ocupacional y personas en contacto frecuente con caninos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las clínicas veterinarias participantes, al laboratorio de Diagnostico Veterinario del Caribe (LABVECA, Barranquilla, Colombia) y a Lizeth Paola Mejía Mendoza, por sus apoyos y colaboración en la recopilación de datos y aportes valiosos a este estudio.

REFERENCES

1. Dumler JS, Barbet AF, Bakker CP, Dasch G, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia with neorickettsia, description of six new species combinations and designatio. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(2001):2145-65.
2. Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and Ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4(3):286-308.
3. Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1063:361-73.
4. Persichetti M-F, Solano-Gallego L, Serrano L, Altet L, Reale S, Masucci M, et al. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasit Vectors* 2016; 9(1):247.
5. Carrillo LM, Betancur S, Roldán D, Pérez JE, Galeano D, Loaiza ÉT, et al. Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de Ehrlichia spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Med Vet y Zootec* 2012; 7(2):38-46.
6. Murphy DS, Lee X, Larson SR, Hoang Johnson DK, Loo T, Paskewitz SM. Prevalence and Distribution of Human and Tick Infections with the Ehrlichia muris -Like Agent and Anaplasma phagocytophilum in Wisconsin, 2009–2015. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2017; 17(4):229-236. DOI: 10.1089/vbz.2016.2055.
7. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. *Vet J* 2011; 187(3):292-6.
8. Dantas-Torres F, Otranto D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. *Trends Parasitol* 2016; 32(1):43-55.
9. Mccown M, Monterroso V, Cardona W. Monitoreo de Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, and Dirofilaria immitis in Dogs From Three Cities in Colombia. *Rev CES* 2015;10:224-31.
10. Labruna MB, Gerardi M, Krawczak FS, Moraes-Filho J. Comparative biology of the tropical and temperate species of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8(1):146-156. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.011.
11. Dantas-Torres F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2015; 4(3):452-61.
12. Dantas-Torres F, Otranto D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of Rhipicephalus sanguineus group ticks. *Vet Parasitol* 2015; 208(1-2):9-13.
13. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol* 2009; 25(5):228-35.
14. Gaunt S, Beall M, Stillman B, Lorentzen L, Diniz P, Chandrashekar R, et al. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit Vectors* 2010; 3(1):33.
15. McCown ME, Alleman A, Saylor KA, Chandrashekar R, Thatcher B, Tyrrell P, et al. Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. *J Spec Oper Med* 2014; 14(4):81-5.
16. Orjuela CJA, García AGF, Imbachi JG. Análisis epidemiológico de la presentación de Ehrlichia sp. en caninos de Florencia Caquetá, Colombia. *Rev Electron Vet* 2015;16(6):1-10.
17. 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.

18. Vargas-Hernández G, André MR, Faria JLM, Munhoz TD, Hernandez-Rodriguez M, Machado RZ, et al. Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. Vet Parasitol 2012; 186(3-4):254-60.
19. Silva-molano RF, Sánchez-ucrós N, Loaiza-echeverri AM. Reporte de presentación de Ehrlichia canis en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. Vet y Zootec 2008; 2(1):27-31.
20. 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.
21. Cowell RL, Valenciano AC. Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. 4th ed. Elsevier Mosby; 2013.
22. Cartagena Yarce LM, Ríos Osorio LA, Cardona Arias JA. Seroprevalence of Ehrlichia canis in Dogs with Suspected Infection by Tick-Borne Pathogens in Medellín, 2012-2014. Rev Med Vet 2015; (29):51-62.
23. Vargas-Hernandez G, André M, Cendales DM, Sousa, Keyla Carstens Marques de Sousa K, Gonçalves LR, Hoepfner Rondelli M, et al. Molecular detection of Anaplasma species in dogs in Colombia. Braz J Vet Parasitol 2016; 29(1):459-64.
24. Nair ADS, Cheng C, Ganta CK, Sanderson MW, Alleman AR, 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.
25. Dagnone A, Souza A, André M, Machado R. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. Rev Bras Parasitol Vet 2009; 18(4):20-5.
26. Al-Adhami B, Scandrett WB, Lobanov V a, Gajadhar A a. Serological cross-reactivity between Anaplasma marginale and an Ehrlichia species in naturally and experimentally infected cattle. J Vet diagnostic Investig 2011; 23(6):1181-8.
27. Akhtardanesh B, Ghanbarpour R, Blourizadeh H. Serological evidence of canine monocytic ehrlichiosis in Iran. Comp Clin Path 2010;19(5):469-74.
28. Movilla R, García C, Siebert S, Roura X, Harrus S, Baneth G, et al. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi (sensu lato), Dirofilaria immitis and Ehrlichia canis in Mexico. Parasit Vectors 2016; 9(1):421.
29. Ybañez AP, Ybañez RHD, Villavelez RR, Malingin HPF, Barrameda DNM, Naquila S V., et al. Retrospective analyses of dogs found serologically positive for Ehrlichia canis in Cebu, Philippines from 2003 to 2014. Vet World 2016; 9(1):43-7.
30. Harrus S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). Vet J 2015; 204(3):239-40.