



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Veterinarias

**“Estudio epizootiológico de
micoplasmas hemotróficos en
perros”**

Doctorando:

Méd.Vet. Esp. Gustavo Pablo Tártara

Director:

Méd.Vet. Dra. Norma Beatriz Pereyra

-año 2022-

Dedicatoria

En los planes estaba que participes de este momento, sentado en primera fila del aula y luego festejar, comentar los pormenores, alguna conversación que incluya el respeto, orgullo y amor mutuo, diciéndolo sin decirlo, como fue siempre. Pero no se puede, de todos modos te la dedico igual porque sé que faltaste por motivos fuerza mayor. Para mi papá, que siempre está...de parte del chambón.

Agradecimientos

A mis padres Susana Riboldi y Pedro Tártara que me plantearon oportuna y claramente las opciones de estudiar o trabajar.

A mi esposa María Eugenia Felizia que siempre supo ver lo mejor en mí y al momento no entiendo como lo logra.

A mis hijos Margarita Eugenia y Gerónimo Pablo que son seres humanos increíbles, de los que aprendo todos los días.

A Norma Pereyra por haberme dirigido en la realización de esta tesis demostrando en todo momento un gran interés en mi producción tanto que en momentos pudo haber sido hasta mayor al mío.

A Ricardo Maggi que con su experticia y solidaridad generó la posibilidad de realizar técnicas de alto perfil.

A Ricardo José Di Masso que me ha sabido orientar, con afecto y ternura.

A las integrantes del proyecto de investigación del cual se originaron los datos que se incluyen en esta tesis: Perla Negro, Silvina González Beltrán, Valentina Cane y Antonella Bolatti que participaron en diversas etapas del trabajo con gran entusiasmo y que han dedicado generosamente su tiempo.

A la Silvia Aiassa y a Eduardo Buticce por su generosidad y empatía.

A todos aquellos que contribuyeron a que haya podido concretar esta etapa.

INDICE GENERAL

Indice de tablas	v
Indice de imágenes, gráficos y figuras	vii
Indice de abreviaturas y símbolos	x
Palabras claves y resumen	xi
Key words and abstract	xiv
Capítulo 1 – Introducción	
1	15
1.1	16
1.2	26
1.2.1	30
1.2.2	32
1.2.2.1	34
1.2.3	35
1.3	36
1.3.1	38
Capítulo 2 – Hipótesis y objetivos	
2.1	40
2.2	40
2.3	40
Capítulo 3 – Materiales y métodos	
3.1	41
3.1.1	42
3.2	42
3.2.1	42
3.2.2	44
3.3	44
3.3.1	44
3.3.2	45
3.4	46
3.4.1	46
3.4.2	47
3.5	48
3.5.1	48
3.6	50
3.6.1	50
3.6.1.1	50
3.6.1.2	51
3.6.2	52
3.6.3	53

3.7	Detección por métodos moleculares de otros agentes causantes de enfermedades vectoriales en sangre y ectoparásitos	54
3.7.1	Detección de otros agentes por PCR	54
3.7.2	Secuenciación de otros agentes detectados por PCR	56
3.8	Análisis estadístico	56

Capítulo 4 – Resultados

4.1	Animales muestrados, lesiones dérmicas y ectoparasitosis	59
4.1.1	Identificación de ectoparásitos	59
4.2	Hallazgos de ectoparásitos en perros de distintas localidades	62
4.2.1	Identificación de ectoparásitos	63
4.3	Detección de MH por métodos directos	66
4.3.1	Observación de ECMH en frotis de sangre de VMO	66
4.3.2	Observación de ECMH en frotis de sangre de VCAB	67
4.3.3	Comparación entre los resultados obtenidos en frotis de sangre de VMO y VCAB	68
4.4	Detección de MH por métodos moleculares	70
4.4.1	Resultados de la PCR	70
4.4.1.1	Resultados de la PCR en sangre	70
4.4.1.1.1	Alojamiento y porcentaje de positivos a PCR	72
4.4.1.1.2	Sexo y porcentaje de positivos a PCR	72
4.4.1.1.3	Raza y porcentaje de positivos a PCR	74
4.4.1.1.4	Lesiones cutáneas y porcentaje de positivos a PCR	75
4.4.1.1.5	Ectoparasitosis y porcentaje de positivos a PCR	77
4.4.1.1.6	Edad y porcentaje de positivos a PCR	78
4.4.1.1.7	Resultados de la PCR en pulgas y garrapatas	80
4.4.2	Resultados generales de la secuenciación	82
4.4.2.1	Resultados de la secuenciación en relación a la variable procedencia geográfica	82
4.4.2.2	Resultados de la secuenciación vinculados al alojamiento	83
4.4.2.3	Resultados de la secuenciación vinculados al sexo	85
4.4.2.4	Resultados de la secuenciación vinculados a la raza	87
4.4.2.5	Resultados de la secuenciación vinculados a la presencia de lesiones cutáneas	90
4.4.2.6	Resultados de la secuenciación vinculados a la presencia de ectoparásitos por localidad	92
4.4.2.7	Resultados de la secuenciación vinculados a la edad por localidad	94
4.5	Resultados de la investigación de otros patógenos	98
4.6	Análisis estadístico	100
4.6.1	Comparación entre la detección de MH por microscopía y por PCR	100
4.6.2	Detección de MH por PCR en sangre y su asociación con diferentes variables	101
4.6.2.1	Asociación entre resultados positivos a la PCR y sexo	101
4.6.2.2	Asociación entre resultados positivos a la PCR y presencia de lesiones de piel	102
4.6.2.3	Asociación entre resultados positivos a la PCR y presencia/ausencia de ectoparásitos	103
4.6.2.4	Asociación entre resultados positivos a la PCR y raza	105
4.6.2.5	Asociación entre resultados positivos a PCR y alojamiento	106

4.6.2.6	Asociación entre resultados positivos a PCR y categoría etaria	107
4.6.3	Asociación entre especies de MH y diferentes variables	108
4.6.3.1	Asociación entre <i>Mycoplasma haemocanis</i> y la presencia de ectoparásitos	108
4.6.3.2	Asociación entre <i>Mycoplasma haemocanis</i> y la presencia de lesiones en piel	110
4.6.3.3	Asociación entre <i>Mycoplasma haemocanis</i> y la presencia de ectoparásitos	112
4.6.3.4	Asociación entre <i>Ca. Mycoplasma haemotaparvum</i> y la presencia de lesiones en piel	113
4.6.3.5	Asociación entre infección por especies de MH y alojamiento	114
4.6.3.6	Asociación entre infección por especies de MH y edad	116

Capítulo 5 – Discusión

5.1	Utilidad de las metodologías aplicadas para la detección de MH: métodos directos y moleculares	118
5.2	Prevalencia de la infección por MH en perros determinada por PCR	120
5.3	Prevalencia de la infección por MH obtenida por PCR asociada a diferentes variables	121
5.4	Detección de diferentes especies de MH detectadas por secuenciación y su asociación con diferentes variables	124
5.5	Detección de otros agentes causantes de enfermedades vectoriales	126
5.6	Relevamiento de ectoparásitos en la región estudiada y detección de MH en pulgas y garrapatas	128

Capítulo 6 – Conclusiones	130
----------------------------------	-----

Capítulo 7 - Bibliografía	132
----------------------------------	-----

INDICE DE TABLAS

Identificación	Referencia	Página
Tabla I	Características generales de la Clase Mollicutes	22
Tabla II	Diferencias entre mollicutes, bacterias y virus	22
Tabla III	Categorías o niveles de infección: cantidad de ECMH por campo microscópico (observación a 1000X)	49
Tabla IV	Procedencia geográfica, alojamiento, edad, raza, sexo de los perros muestreados	61
Tabla V	Hallazgos de ectoparásitos en perros de diferentes localidades	64
Tabla VI	Detección de ECMH en frotis de sangre obtenidos de VMO en perros de diferentes procedencias	67
Tabla VII	Detección ECMH en frotis de sangre de VCAB en perros de diferente procedencia	68
Tabla VIII	Comparación de resultados entre frotis de sangre de VMO y de VCAB	69
Tabla IX	Resultados de la PCR según procedencia geográfica	70
Tabla X	Resultados de la PCR según procedencia geográfica urbana/rural	71
Tabla XI	Resultados positivos a PCR en diferentes alojamientos y localidades	72
Tabla XII	Resultados positivos a PCR de acuerdo al sexo y localidad	73
Tabla XIII	Resultados positivos a PCR en perros según raza y localidad	75
Tabla XIV	Resultados positivos a PCR en perros con y sin lesiones cutáneas en las diferentes localidades	76
Tabla XV	Resultados positivos a PCR en perros con y sin ectoparásitos en las diferentes localidades	78
Tabla XVI	Resultados positivos a PCR en perros de diferentes edades según localidad	79
Tabla XVII	Resultados positivos a PCR en pools de	81

	pulgas y garrapatas por localidad	
Tabla XVIII	Resultados de la secuenciación por localidad	83
Tabla XIX	Resultados de la secuenciación vinculados al alojamiento	85
Tablas XX	Resultados de la secuenciación vinculados al sexo	86
Tabla XXI	Resultados de la secuenciación vinculados a la raza	89
Tabla XXII	Resultados de la secuenciación vinculados a la presencia de lesiones cutáneas por localidad	91
Tabla XXIII	Resultados de la secuenciación vinculados a la presencia de ectoparásitos por localidad	93
Tabla XXIV	Resultados de la secuenciación vinculados a la edad por localidades	96
Tabla XXV	Comparación entre las infecciones por <i>Mycoplasma spp</i> y otros agentes causantes de enfermedades vectoriales	98
Tabla XXVI	Frecuencias absolutas de resultados positivos y negativos a microscopia y PCR	100
Tabla XXVII	Asociación entre resultados positivos de PCR y sexo	101
Tabla XXVIII	Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de lesiones en piel	102
Tabla XXIX	Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de ectoparásitos	104
Tabla XXX	Asociación entre resultados positivos a PCR y raza	105
Tabla XXXI	Asociación entre resultados positivos a PCR y alojamiento	106
Tabla XXXII	Asociación entre resultados positivos a PCR y edad	107
Tabla XXXIII	Asociación entre la infección por <i>Mycoplasma haemocanis</i> y presencia de ectoparásitos	109
Tabla XXXIV	Asociación entre la infección por <i>Mycoplasma haemocanis</i> y presencia de lesiones en piel	110
Tabla XXXV	Asociación entre infección por Ca.M.	112

	haematoparvum y presenciade ectoparásitos	
Tabla XXXVI	Asociación entre la infección por <i>Ca. M. haematoparvum</i> y la presencia de lesiones enpiel	113
Tabla XXXVII	Asociación entre infección por <i>Ca. M. haematoparvum</i> y <i>Mycoplasma haemocanis</i> yalojamiento	115
Tabla XXXVIII	Asociación entre la infección por <i>Ca. M. haematoparvum</i> y <i>Mycoplasma haemocanis</i> yedad	116

INDICE DE IMÁGENES

Identificación	Referencia	Página
Imagen 1	Micoplasma fuente: https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-la-estructura-del-micoplasma-infograf%C3%A1da-illustrati-del-vector-image84774265	21

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Identificación	Referencia	Página
Fotografía 1	<i>Mycoplasma mycoides</i>	2
Fotografía 2	Cara rostral del pabellón auricular del perro: VMO y susramificaciones por efecto de la luz	43
Fotografía 3	Inciso punción con aguja 0,5mmx16mm para obtención de una gota gruesa para el frotis de sangre capilar periférica (VMO)	43
Fotografía 4	El porta objetos se coloca sobre la gota gruesa para obtener una muestra de sangre	43
Fotografía 5	Extensión de la gota de sangre en el portaobjeto. A los efectos de lograr un frotis en capa fina, el extensor debe mantenerse en ángulo menor a 35°	43
Fotografía 6	Guía de identificación de pulgas	47
Fotografía 7	Pulga de gato	65
Fotografía 8	Pulga de perro	65
Fotografía 9	Macho de garrapata	65
Fotografía 10	Hembra de garrapata	65
Fotografía 11	Comparación de tamaños entre macho y hembra de garrapata	65
Fotografía 12	Frotis teñido con May Grünwald.Giemsá: ECMH adheridosa los eritrocitos, observación a 1000X.	66

INDICE DE GRAFICOS

Identificación	Referencia	Página
Gráfico 1	Asociación entre resultados positivos a PCR y sexo	102
Gráfico 2	Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de lesiones en piel	103
Gráfico 3	Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de ectoparásitos	104
Gráfico 4	Asociación entre resultados positivos a la PCR y raza	106
Gráfico 5	Asociación entre resultados positivos a PCR y alojamiento	107
Gráfico 6	Asociación entre resultados positivos a PCR y edad	108
Gráfico 7	Asociación entre <i>Mycoplasma haemocanis</i> y presencia de ectoparásitos	109
Gráfico 8	Asociación <i>Mycoplasma haemocanis</i> y lesiones en piel	111
Gráfico 9	Asociación entre <i>Ca. M. haemotaparvum</i> y Presencia de ectoparásitos	113
Gráfico 10	Asociación entre <i>Ca. M. haemotaparvum</i> y lesiones en piel	114
Gráfico 11	Asociación entre infección por <i>Ca. M. haemotaparvum</i> y <i>Mycoplasma haemocanis</i> y alojamiento	115
Gráfico 12	Asociación por <i>Ca. M. haemotaparvum</i> y <i>Mycoplasma haemocanis</i> y edad	117

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Abreviatura	Significado
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Cc	<i>Ctenocephalides canis</i>
Cf	<i>Ctenocephalides felis</i>
CE	Células endoteliales
CMhp	<i>Candidatus Mycoplasma haemotoparvum</i>
ECMH	Estructuras compatibles con micoplasmas hemotróficos
ETPV	Enfermedad transmitida por vector
ETPVAC	Enfermedad transmitida por vector en animales de compañía
LATAM	Latinoamérica
Kpb	Kilopares de bases
Ms	<i>Mycoplasma suis</i>
MH	micoplasmas hemotróficos
Mhc	<i>Mycoplasma haemocanis</i>
Pb	Par de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPLO	Pleuro pneumonia like organismus
Rs	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
VCAB	Vena cefálica antebraquial
VMO	Vena del margen de la oreja

Estudio epizootiológico de micoplasmas hemotróficos en perros

Palabras claves: micoplasmas hemotróficos - hemoplasmas – *Mycoplasma haemocanis* - *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* – *Mycoplasma suis* – prevalencia – perros - Argentina

Resumen:

Dentro de las enfermedades transmitidas por vectores se incluyen a los micoplasmas hemotróficos (MH), también conocidos como hemoplasmas; en algunas especies animales, las infecciones por estos patógenos pueden inducir una hemólisis aguda, asociada con anorexia, letargo, deshidratación, pérdida de peso y muerte súbita. El desarrollo de ensayos moleculares de alta especificidad y sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de estas infecciones hemoplasmáticas, ha permitido avanzar en el entendimiento de la epidemiología y patogénesis de estos agentes.

Se realizó un muestreo de 162 perros de diferentes localidades en la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR, en la región central de Argentina, con el fin de corroborar la presencia y la prevalencia de la infección por MH en esta región. Se recolectaron muestras de sangre de perros asintomáticos, para las enfermedades provocadas por MH, provenientes de la ciudad de Casilda y localidades cercanas. Se recolectó información referente a diferentes variables como alojamiento, sexo, raza, lesiones cutáneas, ectoparasitosis y edad, que podrían influir en la presentación de la infección por MH. Para la obtención de sangre se utilizaron técnicas de rutina como la punción de la vena marginal de la oreja (VMO) y la extracción desde la vena cefálica antebraquial (VCAB), se realizaron frotis que se tiñeron con May Grünwald- Giemsa; se compararon los resultados de los frotis obtenidos por ambas técnicas. Se utilizó PCR para la detección molecular de MH en todas las muestras de sangre y en los ectoparásitos recolectados, para lo cual se extrajo el ADN y se utilizaron sondas específicas. En las muestras positivas a PCR se realizó secuenciación para la identificación de las especies de MH implicados. Se detectaron estructuras compatibles con micoplasma hemotróficos (ECMH) en los frotis y se confirmó la presencia de MH por PCR determinándose además una prevalencia del 48%. Se relacionó este porcentaje de infección con las variables alojamiento, sexo, raza, lesiones cutáneas, presencia de ectoparásitos y edad. Se detectaron

diferencias significativas en el porcentaje de infección en relación al alojamiento quedando determinada que aquellos perros de domicilio son menos afectados y en el caso de estarlo, predomina la especie *M. haemocanis*. En cuanto a la presencia de ectoparásitos, que fueron en su mayoría *Ctenocephalides felis*, se vio que los perros con pulicosis fueron mayormente afectados por MH y en particular por *Ca. M. haematoparvum*. En cuanto a la edad, el grupo de jóvenes presentó mayor porcentaje de infección mientras que la raza y el sexo fueron variables que no pudieron relacionarse con la infección por MH. También se aplicó PCR y secuenciación sobre las pulgas recolectadas, encontrándose resultados positivos para PCR en la mayoría de los pools de pulgas formados.

Los porcentajes de infección obtenidos tanto por frotis sanguíneos coloreados como por PCR fueron elevados. La prevalencia hallada mediante los frotis de sangre fue de un 58%, mientras que la obtenida por la PCR fue del 48%. Por secuenciación se detectó la presencia de las especies *M. haemocanis*, *Ca. Mycoplasma haematoparvum* y *Mycoplasma suis*. Estos hallazgos indican la presencia de estas bacterias en los perros de la región estudiada. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas de los grados de infección de perros en diferentes alojamientos lo que se podría relacionar con los cuidados sanitarios brindados por los tutores. Por primera vez en la región del estudio, se detectó mediante PCR la presencia de MH en perros con una alta prevalencia. Se confirmaron las especies: *M. haemocanis*, *Ca. M. haematoparvum* y *M. suis*. Pudiéndose observar la mayor prevalencia para *Ca. M. haematoparvum*, seguido por *M. haemocanis*, en perros jóvenes infectados con pulgas.

Epizootiological study of hemotrophic mycoplasmas in dogs

Keywords: hemotrophic mycoplasmas - hemoplasmsa - *Mycoplasma haemocanis* - *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* - *Mycoplasma suis* - prevalence - dogs - Argentina.

Abstract:

Vector-borne diseases include hemotrophic mycoplasmas (HM), also known

as hemoplasmas; in some animal species, infections with these pathogens can induce acute hemolytic anemia, associated with anorexia, lethargy, dehydration, weight loss, and sudden death. The development of highly specific and sensitive molecular assays such as the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of these hemoplasma infections has made it possible to improve the understanding of the epidemiology and pathogenesis of these agents.

A sampling of 162 dogs from different locations in the area of influence of the Faculty of Veterinary Sciences, UNR, in the central region of Argentina, was carried out in order to study the presence and prevalence of hemotropic mycoplasmas (HM) infection in this region. Blood samples from asymptomatic dogs were collected for diseases caused by HM in the city of Casilda and nearby towns. Information regarding different variables such as housing, sex, race, skin lesions, ectoparasitosis and age, which could influence the presence of HM infection, was recorded. Routine techniques such as puncture of the marginal ear vein and extraction from the antebrachial cephalic vein were used to obtain blood. Smears were made and stained with May Grünwald-Giemsa. The results of the smears obtained by both techniques were compared. PCR was used for the molecular detection of HM in all blood samples and in the collected ectoparasites, for which DNA was extracted and specific probes were used. In the PCR-positive samples, sequencing was performed to identify the HM species involved. The percentage of infection was related to the variables of housing, sex, race, skin lesions, presence of ectoparasites and age.

Compatible structures with hemotropic mycoplasmas (CSHM) were detected in the smears and the presence of MH was confirmed by PCR, determining a prevalence of 48%. Significant differences were detected in the percentage of infection in relation to housing, concluding that house dogs are less affected and, if affected, *M. haemocanis* species predominated. Regarding the presence of ectoparasites, which were mostly *Ctenocephalides felis*, it was observed that dogs with pulicosis were mainly affected by HM and in particular by *Ca. M. haematoparvum*. Regarding age, the group of young people presented a higher percentage of HM infection, while race and sex were variables that could not be related. PCR and sequencing were also applied to the collected fleas, finding positive results for PCR in most of the flea pools formed. The presence of the HM species *M. haemocanis*, *Ca. Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma suis* was detected through sequencing.

The percentages of infection obtained by both stained blood smears and PCR were high. The prevalence shown by blood smears was 58%, while that obtained by PCR was 48%. The presence of *M. haemocanis*, *Ca. Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma suis* through sequencing was detected. These findings show the presence of these bacteria in dogs from the studied region. Statistically significant differences between the degrees of infection of dogs in different types of housing, which could be related to the health care provided by their guardians. For the first time in the region under study, the presence of MH in dogs was detected by PCR showing a high prevalence. The species confirmed were: *M. haemocanis*, *Ca. M. haematoparvum* and *M. suis*, and the highest prevalence for *Ca. M. haematoparvum*, followed by *M. haemocanis*, in young dogs infected with fleas could be observed.

1. Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

El estudio de las bacterias transmitidas por vectores ha tomado auge en los últimos años, tanto en el ámbito de la medicina humana como veterinaria (Carson et al., 1992). El interés en estudiarlos y reconocerlos surge por los hallazgos de su presencia y por las patologías a las que se asocian, no solo en animales sino también por su capacidad de generar enfermedades en el hombre (Armstrong et al., 1971).

Entre dichas bacterias se incluyen a los micoplasmas hemotróficos (MH), también conocidos como hemoplasmas (Tasker et al., 2003; Spickler et al., 2010). En algunas especies animales, las infecciones por estos patógenos pueden inducir una anemia hemolítica aguda asociada con anorexia, letargo, deshidratación, pérdida de peso y muerte súbita.

La incapacidad para cultivar los MH *in vitro* ha limitado durante mucho tiempo las posibilidades de investigarlos. Sin embargo, el desarrollo de métodos moleculares de alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de infecciones hemoplasmáticas ha permitido aclarar la epidemiología y la patogénesis de estos agentes (Willi et al., 2007).

Los integrantes de la Clase *Mollicutes* son filogenéticamente diversos, e incluyen más de 150 especies en ocho géneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Mesoplasma* y *Entomoplasma* (Tully, 1993). El término micoplasma se usa comúnmente para describir cualquier miembro de esta clase, todos los cuales se caracterizan por no poseer pared celular (mollicutes: *mollis*, suave o blanda; *cutis*, piel). Los MH constituyen un grupo dentro del Género *Mycoplasma*; son los únicos micoplasmas con tropismo por los glóbulos rojos.

En los frotis sanguíneos, los MH se pueden observar adheridos a la membrana celular de los glóbulos rojos, de allí que se definen como epieritrocitarios, aunque también pueden encontrarse libres en el plasma, entre los eritrocitos, en forma individual o en cadena (Messick et al., 2004, Santos et al., 2014).

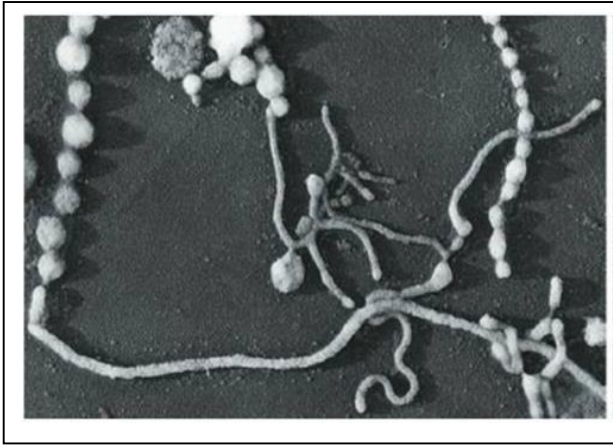
La primera documentación de un microorganismo de esta naturaleza en animales de compañía se hizo en Sudáfrica en 1942 a partir de un gato anémico donde se detectaron bacterias de ubicación epieritrocitaria (Sykes et al., 2005, Shaw, et al. 2004). Anteriormente los MH pertenecían a los géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* del Orden Rickettsiales y se han reclasificado en el género *Mycoplasma* de acuerdo a estudios basados en el gen del rRNA 16S (Messick et al., 2002; Balish y Krause, 2006).

1.1 Características generales de los micoplasmas

Los micoplasmas son bacterias que se presentan como organismos comensales u oportunistas patógenos en plantas, mamíferos, reptiles, aves e insectos (Greene, 2002).

El primer micoplasma descrito en 1898 por Nocard y Roux, fue el hoy conocido como *Mycoplasma mycoides* aislado desde casos de pleuroneumonía bovina. Durante ese período se aisló, desde ovejas y cabras, la segunda especie de micoplasma, y *a posteriori* en el siglo XX, fueron identificadas una gran cantidad de especies lo que originó la denominación Pleuropneumoniae like organisms o "PPLO". En humanos, el primero fue, *Mycoplasma hominis* que se recuperó en 1937 desde un paciente de sexo masculino con uretritis, y nuevamente en 1938 en una mujer a partir de un absceso de las glándulas de Bartolino (dos glándulas secretoras diminutas situadas a cada lado de la apertura de la vagina en humanos) (Ortiz Ibarra, 2009).

En 1944, Eaton et al. lograron aislar *M. pneumoniae* de un caso de neumonía atípica primaria en humanos. Sin embargo, no fue hasta 1960 cuando se definió correctamente al género *Mycoplasma*, incluyendo bacterias que se describen con formas parecidas a los hongos filamentosos, ya que si bien se reproducen por fisión binaria, la replicación del genoma puede preceder a la división citoplásmica, dando lugar a la formación de filamentos multinucleados, lo que origina la denominación de micoplasmas: mico: hongo, plasma: sangre (fotografía 1).



Fotografía 1: *Mycoplasma mycoides*.

Microfotografía con el microscopio electrónico de transmisión. Obsérvense los elementos cocoidales y en forma de hifa. El diámetro medio de las células que forman las cadenas es de aproximadamente 0,5 μm (Madigan, 2009).

Aunque pueden observarse como Gram negativos porque no poseen pared celular, los micoplasmas están emparentados filogenéticamente a las bacterias Gram positivas tanto no esporulantes como formadoras de endosporas. Son organismos que probablemente tuvieron pared celular pero dejaron de necesitarla; debido a sus hábitats tan especiales, evolucionaron hacia bacterias sin pared y con una membrana celular diferente a la de otros procariontes (Shmuel, 1996).

Los micoplasmas más conocidos son parásitos de las mucosas animales; habitan tanto en hospedadores animales como vegetales. La carencia de pared celular es fácilmente observable con el microscopio electrónico. Esta ausencia de pared se puede confirmar mediante análisis químico, que demuestra la ausencia de componentes claves de la pared como peptidoglicano, y de los ácidos teicoicos (Morris, 2020). Son resistentes a la lisis osmótica en medios de diferente osmolaridad que la de su citoplasma y son capaces de sobrevivir ante condiciones que provocarían la lisis de los protoplastos ya que han logrado una adaptación mediante evolución (Imagen 1).

Su capacidad para evitar la lisis osmótica, en medios de diferente osmolaridad que la de su citoplasma está al menos parcialmente basada en la presencia de esteroides en las membranas celulares, que hacen que estas membranas citoplásmicas sean más estables que las de otras bacterias. Existen compuestos denominados lipoglicanos, heteropolisacáridos de cadena larga unidos covalentemente a lípidos de membrana e insertados en la

membrana citoplasmática de muchos micoplasmas. Los lipoglicanos se parecen a los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, excepto que carecen del lípido A, que es la endotoxina de las Gram negativas, y del fosfato típico de los lipopolisacáridos bacterianos (Hammerschlag, 2019).

Los lipoglicanos ayudan a estabilizar la membrana citoplasmática y facilitan la adhesión de los micoplasmas a los receptores de la superficie celular de las células animales. Al igual que los lipopolisacáridos, los lipoglicanos también inducen la producción de anticuerpos cuando son inyectados en animales de experimentación (Tabla 1 y Tabla II).

Los elementos pequeños de morfología cocoide (0,2-0,3 μm) son las menores células bacterianas capaces de crecimiento independiente. Los genomas de los micoplasmas son también menores que los de otras bacterias, en la mayoría de los casos sus tamaños varían entre 500 a 1.100 kpb de ADN. Lo anterior es comparable al tamaño del genoma de los géneros de vida intracelular obligada como *Chlamydia* y *Rickettsia* y aproximadamente una cuarta parte del de *Escherichia coli*. Por ejemplo, el genoma de *Mycoplasma genitalium* tiene sólo 580 kpb. Cuando el genoma de *M. genitalium* se secuenció en 1995 su tamaño muy pequeño se consideró cerca del límite mínimo necesario para que una célula fuera capaz de llevar a cabo los procesos necesarios para la vida. Sin embargo, desde entonces se han encontrado varios genomas procariontes aún más pequeños, algunos radicalmente menores (Lluch Senar; 2010).

El medio de cultivo para micoplasmas es complejo, por lo que muchas especies no pueden crecer o crecen muy poco, incluso en medios suplementados con extracto de levadura, peptona e infusión de corazón bovino. Debido a la capacidad metabólica limitada, que es una consecuencia de su genoma pequeño y falta de pared celular, son frágiles y desafiantes para su cultivo. Por lo tanto, el cultivo es un método de escasa sensibilidad para el diagnóstico (Rosendal, 1978; Barile et al., 1970). Cada especie no puede diferenciarse por la morfología y deben ser identificadas por estudios bioquímicos, nutricionales o serológicos, sin embargo, la reactividad cruzada entre especies es posible (Edward et al., 1951). Por fortuna, la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) ha sido desarrollada para detectar organismos micoplasmáticos a partir de muestras de cultivo y especímenes clínicos y para identificar especies con precisión (Chalker, 2005).

En humanos, el diagnóstico de las infecciones causadas por micoplasmas y ureaplasmas se ha visto limitado durante mucho tiempo por el crecimiento dificultoso de estos microorganismos, aunque en los últimos años el avance en la metodología diagnóstica a través de técnicas serológicas y sobre todo debido a métodos de amplificación de ácidos nucleicos, ha propiciado un aumento en su detección y, consecuentemente, en la apreciación de la importancia clínica de estos microorganismos.

Con respecto al cultivo, todas las especies de micoplasmas cultivables requieren medios de cultivos complejos, con suplemento de esteroides, ácidos grasos y aminoácidos. El cultivo de los micoplasmas de origen humano sólo se debe realizar para el aislamiento de especies con potencial patogénico definido y crecimiento razonablemente satisfactorio en medios específicos estandarizados, como *Ureaplasma* spp., *M. hominis* y *M. pneumoniae* (Acosta Boga, 2011; Dosa et al., 1999; Waites, 2001).

El crecimiento de los micoplasmas cultivables, como se dijo, requiere la presencia de suero, factores de crecimiento como extracto de levadura y un sustrato metabólico. No existe una formulación ideal para todas las especies, con los requerimientos de pH y sustratos adecuados. El caldo 10B de Shepard, y el caldo urea-arginina pueden ser utilizados para aislar *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. La penicilina G o una penicilina semisintética se utilizan para evitar el sobrecrecimiento de otras bacterias. El rojo fenol se incluye en el caldo como indicador de crecimiento (cambio del pH). El agar diferencial A7 y varias modificaciones del mismo (A7B, A8), son particularmente útiles porque permiten el crecimiento de *M. hominis* y *U. urealyticum* y diferencian una especie de otra por la morfología de la colonia. Combina una base nutritiva a base de peptonas, suero de caballo y factores de crecimiento (cisteína, PolyVitex, arginina y urea) que favorecen el desarrollo de las colonias de micoplasmas. La mezcla antibiótica del medio inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas. Existen medios comerciales

disponibles como Mycotrim Triphasic® (antes llamado Mycotrim GU), que incluye un medio bifásico que contiene agar diferencial A8 y caldo urea-arginina en un frasco de cultivo celular, con rojo fenol como indicador. El sistema Micoplasma IST bioMérieux®, permite la detección de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* con un resultado cuantitativo y el estudio de la sensibilidad. El uso combinado del caldo Urea-Arginina (Micoplasma IST bioMérieux®) y el Agar A7 bioMérieux®, es adecuado como medio de aislamiento.

La inoculación debe hacerse en ambos medios, líquido y sólido, para poder diferenciar el tipo de colonia, la posibilidad de cultivos mixtos y la cuantificación de los aislados. Los caldos se incuban a 37°C en atmósfera aerobia. Las placas de agar deben incubarse en atmósfera suplementada con 5-10% de CO₂, ya que *Ureaplasma* spp. requiere CO₂ para su crecimiento y las colonias de *M. hominis* crecen mejor. Se deben observar los cambios de color en los viales de caldo a partir de las 24 horas de incubación (especialmente en el caso de *Ureaplasma* spp.). *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. al crecer y liberar amonio de sus respectivos sustratos producen cambio de color del medio del amarillo al naranja-rojo-púrpura en 24 horas, excepto en el caso de muestras con títulos muy pequeños en las que el cambio se producirá luego de las 48 horas. En el caso de *M. hominis* aparece una ligera turbidez, y en caso de *Ureaplasma* spp. el caldo permanece transparente. En ambos casos el subcultivo a medio sólido debe ser realizado precozmente una vez que se produce el cambio de color, debido a la rápida pérdida de viabilidad una vez que se alcaliniza el medio. Los subcultivos se inspeccionan diariamente, de la misma manera que el cultivo inicial. El subcultivo en placa de agar se hará dispensando en cada placa 3 gotas del caldo, sin estriar. El rápido crecimiento de estos micoplasmas permite la identificación de la mayoría de los cultivos positivos en 2-4 días de incubación. En ocasiones *M. hominis* puede crecer tras incubación prolongada, en medios convencionales como agar sangre base Columbia o chocolate, donde producen colonias pequeñísimas y transparentes, que teñidas al Gram no permiten observar ningún microorganismo. La confirmación de que corresponden a *M. hominis* se obtiene mediante el arrastre de una pequeña pieza de agar que las contenga sobre una placa de agar A7 o mediante su introducción en caldo de arginina. En los cultivos cuantitativos de *Ureaplasma* spp. realizados mediante diluciones seriadas con

medios preparados en el laboratorio, al final del período de incubación se anotará el título máximo de crecimiento del organismo. La dilución más alta que muestre cambio de color equivale al recíproco del número de unidades cambiadoras de color (UCC) presentes en el inóculo original. Los títulos de crecimiento se expresarán en UCC/ml. Si se realiza el recuento de colonias, siempre se debe realizar según las instrucciones del fabricante cuando se utilizan medios comerciales, y teniendo en cuenta las diluciones utilizadas en cada caso. Cuando la cuantificación se hace por crecimiento en placas de agar, los títulos de crecimiento se expresarán en unidades formadoras de colonias. La lectura de las placas se puede hacer con microscopio invertido orientando la superficie del agar hacia arriba, o con microscopio estereoscópico de epiiluminación orientando la superficie hacia abajo, con aumento 40x y 100x. Las colonias de *Ureaplasma* spp. en agar A7, A7B y A8 presentan un aspecto característico de “erizo de mar”, entre 15-50 μm de diámetro y de color marrón oscuro debido a la deposición de sales de manganeso (agar A7) o de CaCl_2 (agar A8) sobre la colonia. Las colonias de *M. hominis* aparecen con su aspecto característico de “huevo frito”. La identificación de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* en la práctica clínica, se puede realizar sin necesidad de otras pruebas o reactivos adicionales. La identificación completa a nivel de especie requiere otras pruebas como la PCR. Lo anteriormente descrito ilustra la complejidad del cultivo e identificación de los micoplasmas cultivables, lo que se debe como ya se explicó, al pequeño tamaño de su genoma, que hace que no cuenten con todas las vías metabólicas para la formación de nuevos compuestos necesarios para su replicación (Meseguer-Peinado et al., 2012).

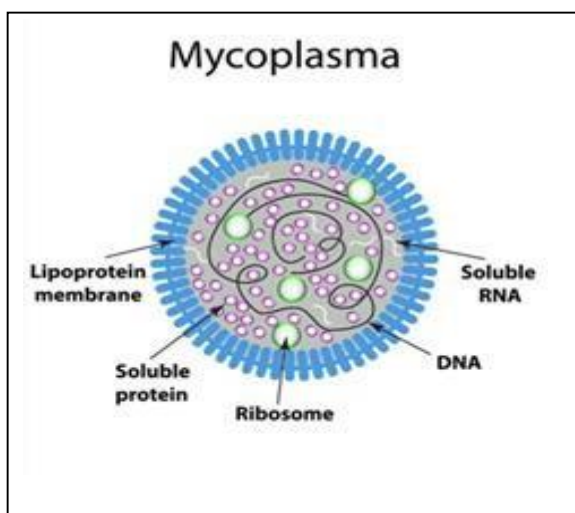


Imagen 1: Micoplasma. La membrana celular con lipoproteínas es la cubierta más externa ya que no posee pared celular. Fuente: <https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-la-estructura-del-micoplasma-infograf%C3%ADa-illustrati-del-vector-image84774265>

La imagen 1 es un esquema descriptivo de micoplasmas, en la cual puede apreciarse que no poseen pared celular. La membrana celular con lipoproteínas es la cubierta más externa. Cada célula suele medir 1 μm de diámetro. Su ADN oscila entre 580 - 1380 kpb (kilopares de bases). Su 16S ARN ribosomal lo relaciona como se dijo, con la Clase *Mollicutes*.

Tabla I: Características generales de la Clase Mollicutes.

Comparación con bacterias con pared celular.

Características	<i>Mollicutes</i>	Otras Bacterias
Pared celular	Ausente	Presente
Membrana	Rica en colesterol	Sin colesterol
Tamaño del genoma	580-2.220kb	1,050>10.000kb
Contenido de G+C	23-40 mol%	25-75 mol%
Número de operones de rRNA	104-113 nt	>114nt
Número de genes de tRNAs	30(<i>M. capricolum</i>), 33 (<i>M. pneumoniae</i>)	84 (<i>Bacillus subtilis</i>), 86 (<i>E. coli</i>)
Uso del codón UGA	Trp en <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureoplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> y <i>Mesoplasma</i>	Stop
RNA polimerasa	Resistente a rifampicina	Sensible a rifampicina

Tabla II: Diferencias entre mollicutes, bacterias y virus

Características	Mollicutes	Bacterias	Virus
Contienen ADN y ARN a la vez	+	+	-
Poseen varios sistemas metabólicos	+	+	-
Se reproducen en medios sin células	+	+	-
Atraviesan filtros de 0,22 μm	+	-	+
Presentan pared celular	-	+	-
Sensibles a la penicilina	-	+	-
Sensibles a la tetraciclina	+	+	-

Fuente: Howard C. y Gouray R., 1978

Patogenicidad de los micoplasmas. En cuanto a los determinantes potenciales de virulencia están codificados en el genoma de micoplasmas patógenos. Algunas especies poseen múltiples tipos de factores de virulencia como adhesinas y proteínas accesorias, estructuras polisacáridas extracelulares, y lipoproteínas proinflamatorias o proapoptóticas de membrana, que son producidas por múltiples especies.

Varias especies excretan subproductos potencialmente tóxicos del metabolismo intermedio, incluyendo peróxido de hidrógeno, radicales superóxido o amoníaco. Otros, como las endopeptidasas extracelulares, las nucleasas y las glicosidasas parecen distribuirse irregularmente en el género, mientras que la citotoxina ADP-ribosilante y vacuolizante (análogo de la subunidad S1 de la exotoxina pertusis) de *Mycoplasma pneumoniae* y el mitógeno (superantígeno) de los linfocitos T. Existen reportes de una exotoxina elaborada por *Mycoplasma neurolyticum*, pero trabajos posteriores no han podido corroborar la presencia esa toxina (Tryon y Baseman, 1992).

Los mecanismos de virulencia, como la formación de biofilm o la invasión intracelular facultativa, se expresan en una serie de especies patógenas. Varias especies poseen sistemas de antígenos superficiales variables que se cree que son importantes en la evasión de las respuestas inmunes adaptativas de los hospedadores. Un gran número de especies pueden suprimir o estimular inadecuadamente las células inmunitarias de los hospedadores, sus receptores y citoquinas.

A pesar del avance en los últimos años a través de la secuenciación genómica, la base molecular de la patogenicidad y las relaciones causales con la enfermedad aún deben establecerse definitivamente para la mayoría de estos factores (Razin, 1994). Debido a que carecen de lipopolisacárido y una pared celular, y no sintetizan sus propios nucleótidos, son intrínsecamente resistentes a polimixinas, β -lactamas, vancomicina, fosfomicina, sulfonamidas y trimetoprim. Tampoco es efectiva la rifampicina debido a que su ARN polimerasa no está afectada por ese antibiótico (Waites y Bébéar, 2001). Un grupo reducido de especies exhiben un espectro aún más amplio de resistencia a los antibióticos, como a la eritromicina y la azitromicina, que aparentemente está mediada por mutación en el rRNA 23S (Pereyre et al., 2002).

Micoplasmas cultivables que afectan al perro. Constituyen un grupo reducido, en el cual se desconoce la importancia de todas las especies. La primera aparición documentada de micoplasmas en perros fue en 1934 (Shoetensack, 1934). En los últimos 90 años, se describieron 15 especies micoplasmas caninos más dos especies que aún no fueron completamente descritas y nombradas: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovigentialium*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma maculosum*, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma spumans*, *Ureaplasma canigenitalium* y *Mycoplasma* sp. HRC 689, *Mycoplasma* sp. VJC358 (Chalkert et al., 2005).

Pueden mencionarse especies que producen enfermedades respiratorias como *M. cynos* y otras que producen infecciones en el tracto urogenital (ITU) como *M. canis*. Sin embargo, el concepto de micoplasmas patógenos para caninos es vago ya que se han aislado varias especies de micoplasmas vinculadas a otras especies animales en perros y viceversa. En 1975, Rosendal afirmó que el término micoplasma canino sólo debe aplicarse a aquellas especies de micoplasma que han sido aisladas únicamente de perros o son frecuentemente aislados de perros y rara vez aislado de otros hospedadores. Por lo tanto, todas las especies de micoplasmas que pueden aislarse o ser detectados en perros están incluidas y las especies que se encuentran en más de un hospedador se discuten.

Debido a las dificultades para identificar las especies de micoplasmas caninos, la mayoría de los estudios han investigado la presencia o ausencia de micoplasmas en una variedad de muestras clínicas y se sabe poco sobre infecciones específicas causadas por especies de micoplasmas. Sabemos que los perros son expuestos por primera vez y colonizados por micoplasmas al pasar a través del canal de parto (Eberle y Kirchhoff, 1976).

En los perros, principalmente *M. canis*, se consideran parte de la microbiota de las membranas mucosas, como la conjuntiva, tracto respiratorio superior y tracto urogenital (Ogata, 1984; Biberstein y Hirsh, 2002). Sin embargo, algunos de estos micoplasmas pueden causar enfermedades como

ITU por migración ascendente desde la parte inferior del tracto urinario o genital (Jang et al., 1984). Si bien no son numerosos los informes de ITU asociados con *M. canis* ya debería considerarse como diagnóstico diferencial la posible presencia de estas bacterias como etiología de las infecciones urinarias (Koshimizu y Ogata, 1974; Jang et al., 1984; Ulgen, 2006).

Con respecto al aparato respiratorio de los perros, se cree que muchos *Mycoplasma* spp. forman parte de la microbiota de las vías respiratorias superiores (Koshimizu y Ogata, 1974). Un estudio reciente que evaluó el microbioma de perros sanos mostró que se detectaron micoplasmas en frecuencia decreciente desde la cavidad nasal hasta las vías respiratorias inferiores (Ericsson et al., 2016). Esto podría indicar que la colonización del tracto respiratorio inferior (TRI) por micoplasmas puede surgir de las vías respiratorias superiores. Como han sido aislados en cultivo puro de perros con enfermedad respiratoria baja, se sugiere que pueden ser patógenos respiratorios primarios en perros (Chandler, 2002).

Los micoplasmas pueden aislarse de TRI con mayor frecuencia en perros de 1 año de edad (Randolph et al., 1993). Como tal, *Mycoplasma* spp. puede jugar un papel en el complejo de enfermedades respiratorias infecciosas en perros. Es posible, sin embargo, que los signos clínicos puedan ser más atribuibles a virus o *Bordetella* spp. en lugar de a la infección primaria por micoplasma en cachorros (Jambhekar, 2018).

Entre los micoplasmas no cultivables que afectan a los perros se encuentran los MH o hemoplasmas; los mismos no se pueden recuperar en cultivo a partir de muestras clínicas, a diferencia de los anteriores, que afectan a las mucosas. Para el diagnóstico de las infecciones por MH en perros se emplean técnicas moleculares como la de PCR, que se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad (Meseguer Peinado et al., 2012).

1.2 Características de los micoplasmas hemotróficos

Como se explicó, dentro del género *Mycoplasma* se incluye el grupo de los MH. Éstos infectan una variedad de animales (hasta ahora sólo mamíferos) tanto salvajes como domésticos y son relativamente específicos del hospedador, aunque se ha informado de infecciones cruzadas entre hospedadores relacionados (Williy et al., 2006, 2005).

El grupo de MH del Gro. *Mycoplasma* se incluía anteriormente en los Géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* (Neimark et al., 2001). Como ya se dijo, son pequeñas bacterias (<1 µm), pleomórficas que se unen a los glóbulos rojos de varias especies de mamíferos. Hasta hace poco, eran clasificados como organismos rickettsiales, basados en su pequeño tamaño, no poseer pared por tanto aparentan propiedades de tinción Gram negativa, parásitos de glóbulos rojos y transmisión por artrópodos hematófagos (Ristic y Kreier, 1984). Sin embargo, su caracterización molecular basada principalmente en la secuenciación del gen 16S rRNA reveló una relación más estrecha con los miembros de la Clase Mollicutes (Neimark et al., 2001, Rikihisa et al., 1997). Algunas de las características fenotípicas son, en este caso, el tamaño pequeño de los organismos y su genoma, la falta de una pared celular y flagelos, la resistencia a la penicilina y la susceptibilidad a la tetraciclina. Los géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* fueron reclasificados dentro del género *Mycoplasma* como micoplasmashemotróficos (Neimark et al., 2001).

Los primeros estudios basados en la secuenciación del gen rRNA 16S revelaron la existencia de dos hemoplasmas distintos en gatos domésticos, originalmente aislados de Ohio denominados *Haemobartonella felis* (Berent et al., 1998; Messick et al., 1998; Rikihisa et al., 1997; Foley et al., 2001). Junto con la reclasificación, los aislamientos de Ohio y California fueron renombrados *M. haemofelis* (Neimark et al., 2001) y *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (Foley y Pedersen, 2001), respectivamente. Más recientemente, se identificó un nuevo tercer micoplasma hemotrópico en un gato mascota suizo, designado *Candidatus M. turicensis* (Williy et al., 2006, 2005). El estatus de *Candidatus* para organismos recién identificados refleja un estado provisional de procariontes incompletamente descritos y se mantiene hasta que se disponga de más características para una clasificación final

(Neimark et al., 2001).

Los MH hemotrópicos felinos muestran una relación filogenética muy estrecha con hemoplasmas de roedores y caninos. Las secuencias de los genes rRNA 16S derivadas de *Candidatus M. turicensis* muestran las identidades más altas a las de *M. coccoides* (92%) y *M. haemomuris* (90%), que son ambos hemoplasmas de roedores (Willi et al., 2005). Las secuencias del ARNr 16S de *M. haemofelis* y *Candidatus M. haemominutum* muestran identidades de 99% y 94% con las de los hemoplasmas caninos *M. haemocanis* y *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, respectivamente; Sin embargo, muestran menos identidad, lo que dejó en claro que los hemoplasmas caninos y felinos representan de hecho especies distintas (Birkenheuer et al., 2002; Sykes et al., 2005).

Los análisis filogenéticos basados en las secuencias del gen rRNA 16S revelan que los hemoplasmas felinos se localizan dentro de diferentes subgrupos de MH. Se observa un patrón de agrupamiento similar para hemoplasmas caninos y bovinos (ej.: *Candidatus M. haemobovis*, hemoplasma bovino descubierto en Suiza Hofmann-Lehmann et al., 2004). Se ha especulado que las especies de hemoplasmas de diferentes grupos se diferencian en patogenicidad y para caracterizarla harían falta estudios genéticos adicionales.

Al estudiar las especies de hemoplasmas felinos sobre la base de comparaciones de secuencias utilizando ensayos de PCR, se han determinado diferencias entre los tres micoplasmas felinos, aunque estos muestran una identidad del 97% con los hemoplasmas de los felinos salvajes, esto podría indicar un intercambio de especies de MH entre felinos domésticos y salvajes a través de vectores hematófagos (Tasker et al., 2003a; Willi et al., 2006, Willi et al., 2007).

Estos MH son parásitos epieritrocitarios *in vivo*, y sólo pueden replicarse en el laboratorio recurriendo a especies animales susceptibles a las que se haya esplenectomizado. *Mycoplasma haemofelis* (forma grande de *Haemobartonella felis* cepa Ohio), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (forma pequeña de *Haemobartonella felis* o cepa California) y *Candidatus Mycoplasma turicensis* afectan al gato, mientras que *Mycoplasma haemocanis*

(antes *Haemobartonella canis*) y *Candidatus Mycoplasma haemoparvum* afectan al perro. El análisis de secuencias del gen de rRNA 16S de *Mycoplasma haemofelis* y *Candidatus Mycoplasma haemominutum* muestra una identidad del 99% y 94% con los hemoplasmas caninos *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum*, respectivamente; sin embargo, otros genes muestran menor identidad, determinando que se trata de especies diferentes (Messik, 2003; Messik, 2004; Willi, 2006; Willi, 2007 y Willi, 2010).

La transmisión de MH se produce a través de sangre infectada, la cual puede ser inoculada en un individuo no infectado (por ejemplo, a través de jeringas) aunque también se ha comprobado la transmisión por ingestión. La transmisión vectorial por artrópodos como pulgas, garrapatas y piojos de algunas especies está probada por la experimentación (Sykes et al., 2010a; Willi et al., 2006b). Se acepta que no se conocen todos los mecanismos de transmisión. En cerdos no se pudo probar la transmisión transplacentaria, aunque sí se confirmó en alpacas (Almy, 2006). La transmisión por piojos en rumiantes y cerdos ha sido demostrada durante la década de los 80 (Hornoka, 2010). En el caso de los cerdos, la presencia de MH se constató en secreciones nasales y saliva mediante la técnica de PCR, por lo que se asume que también podría transmitirse por estas vías al igual que por jeringas, ingestión de orina, secreciones nasales y vaginales (Dietz, 2014). Mediante PCR, también se detectaron en saliva de gatos, de modo que se asumió como una posible vía de transmisión, la cual no se ha comprobado en perros aún (Dean, 2007).

Diversos autores documentaron que la hemoplasmosis en gatos puede transmitirse mediante vectores hematófagos y transfusiones sanguíneas, por calostro (Mendez Arriola y Hidalgo Armijos, 2013; Bergmann et al., 2017) y en forma directa mediante saliva (Museux et al., 2009).

La patogenicidad (capacidad de producir daño) de diferentes hemoplasmas es variable en diferentes especies animales, y probablemente, la virulencia de la cepa también desempeña un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, *Mycoplasma haemofelis* puede inducir una enfermedad clínica aguda en gatos no esplenectomizados e inmunocompetentes, mientras que *Mycoplasma haemocanis* parece ser capaz de inducir la enfermedad solamente en perros inmunosuprimidos o

esplenectomizados. Los síndromes clínicos van desde la anemia hemolítica fatal aguda hasta la anemia insidiosa crónica.

Los signos de la enfermedad pueden incluir anemia, pirexia, anorexia, deshidratación, pérdida de peso e infertilidad. Se ha demostrado en algunos animales infectados con hemoplasmas la presencia de anticuerpos que se unen a eritrocitos (incluyendo crioaglutininas), detectadas por pruebas de Coombs positivas, que generan anemia. Los animales pueden permanecer portadores asintomáticos crónicos de hemoplasmas después de una infección aguda y solo las técnicas moleculares como PCR pueden detectarlos, por lo que se consideran prueba patrón o de oro (Happia, 2018; Oliveira Conrado, 2015).

Se ha documentado que los MH pueden vincularse con anemia en perros (Kaewmongkol, 2017; Zobba, 2020; Steer, 2011), y *R. sanguineus* participa como vector de estos microorganismos, como se ha reportado en EE. UU. (Sykes et al., 2010).

Por otra parte, la transmisión experimental en perros se ha demostrado mediante administración oral y parenteral de sangre infectada (Barker et al., 2010) y también se dejó claro que no es necesario que los perros estén esplenectomizados para que puedan contagiarse (de Morais et al., 2003). La principal forma de transmisión es probablemente a través de artrópodos hematófagos, como la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* y las pulgas *Ctenocephalide felis* y *C. canis* cuyas distribuciones geográficas principales están asociadas con los climas mediterráneo y submediterráneo (Willi et al., 2006a; Dantas-Torres, 2008; Foley et al. 2007, Woods, 2005; Groves, 1975). La presencia de ectoparásitos hematófagos en perros es un factor que se debe tener muy en cuenta en este tipo de patologías (Uspensky et al., 2002).

La unión de los MH epicelulares a la superficie de los eritrocitos caninos, causan anemia hemolítica principalmente a través de la destrucción de los eritrocitos por el sistema de fagocitos mononucleares. La infección que se produce con estos hemoplasmas generalmente solo induce anemia clínicamente significativa en perros esplenectomizados o

inmunocomprometidos, aunque las infecciones latentes pueden causar anemia subclínica (Greene, 2002; Messick, 2001; Grenne, 2008).

Por otro lado, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* se describió por primera vez en asociación con anemia en un perro esplenectomizado sometido a quimioterapia para la leucemia (Sykes, 2005). Pero la mayoría de los perros no esplenectomizados infectados con hemoplasmas no desarrollan evidencia clínica de enfermedad y no tienen suficiente cantidad de microorganismos presentes en la sangre para ser reconocidos durante los exámenes de rutina a través de un frotis sanguíneo (Sharifiyazdi et al., 2014; Barker, 2010 y Criado-Fornelio, 2003).

1.2.1 Los MH de los perros

El primer MH descrito en perros fue *Mycoplasma haemocanis*; esta bacteria, junto a otros MH del género, representan un nuevo grupo de micoplasmas y se les ha dado el nombre trivial de hemoplasmas (Neimark, 2001; Rikihisa, 1997). Se acepta que *M. haemocanis* es un patógeno sanguíneo que puede causar anemia hemolítica manifiesta en perros esplenectomizados (Hulme-Moir, 2010; Messick, 2002) y en personas inmunodeprimidas (Bellamy, 1978; Messick, 2002). En Europa fue descrita otra especie que afecta al perro, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, que muy posiblemente se comporte en forma similar a *M. haemocanis*, aunque como sucede en el gato, pueden existir diferencias de patogenicidad entre los hemoplasmas que afectan una especie animal (Sykes, 2003; Wengui, 2008). A continuación se describen los MH reconocidos en perros hasta el momento.

Mycoplasma haemocanis. En 2005 se recharacterizó *Mycoplasma haemocanis*, nuevo nombre de *Haemobartella canis* (Kikuth, 1928; Messick, Walker, Raphael, Berent y Shi, 2002). *Bartonella canis* Kikuth, 1928; *Haemobartonella* (*Bartonella*) *canis* (Kikuth 1928, Tyzzer y Weinman, 1939; Ristic y Kreier, 1984); el nombre proviene de hema: sangre y canis: perro. Las células son de cocoides a pleomórficas. La morfología de los eritrocitos

infectados se altera, lo que demuestra una marcada depresión en el sitio de fijación de *Mycoplasma haemocanis*. Se considera patógeno: causa anemia hemolítica en perros domésticos. La transmisión puede producirse por vectores como la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*). Se ha observado en asociación con eritrocitos de perros domésticos (Hoskins J.D., 1991). Contenido de ADN G + C (% en moles): no determinado. Tipo de cepa: no establecido. Secuencia de acceso no. (Gen 16S rRNA): AF197337.

La hemobartonelosis canina producida por *Mycoplasma haemocanis* siempre se consideró acotada a los perros esplenectomizados, a diferencia de las infecciones por hemoplasmas que afectan a gatos, cerdos y ovejas, que se presentan como graves e inclusive fatales y que afectan a animales no esplenectomizados (Gómez, 2010; Grenne, 2008; Messik, 2004; Neimark, 2001).

Como ya se mencionó, la mayoría de los perros infectados a los que no se les realiza esplenectomía no desarrollan evidencia clínica de enfermedad, aunque si se han presentado casos como el descrito por García Luccioni en 2018 en donde una perra, residente en el País Vasco, de cinco años presentó un grave cuadro de anemia que se pudo vincular a una infección por MH (Grenne, 2008; Messick, 2003; Messik, 2004; Neimark, 2001; Willi, 2007).

Los perros infectados en forma latente manifiestan la enfermedad luego de la esplenectomización: sin esplenectomía, es probable que la anemia sea tan leve que no se detecte y que la cantidad de microorganismos en sangre no sea suficiente para su reconocimiento durante el examen de rutina del extendido sanguíneo (Messick, 2003; Messick, 2004; Neimark, 2001).

Se ha informado, luego de realizar infecciones experimentales en perros, que el período prepatente después de la inyección intravenosa de sangre infectada a animales esplenectomizados, varía desde 1-2 días hasta 2 semanas. En la mayoría de los casos, los perros inoculados presentan una anemia aguda, que progresa de manera rápida, asociada con parasitemia prácticamente constante, y en general, en estos animales se produce la muerte dentro del mes pos-inoculación. En pocos casos el desarrollo de la anemia es más gradual como resultado de episodios parasitémicos periódicos; los perros infectados se tornan apáticos, presentan mucosas pálidas, pero en

general muestran temperatura rectal y apetito normales (Gómez, 2010; Grenne, 2008). A menos que se presenten otras enfermedades, los signos clínicos son poco evidentes en los perros naturalmente infectados (sin esplenectomía) con *M. haemocanis* (Gómez, 2010; Grenne, 2008; Messick, 2003; Neimark, 2001; Wengui, 2008; Willi, 2010). De la misma manera, en estudios realizados en la especie porcina, se informó que más del 50% de los casos registrados en Argentina, estaban asociados a otras enfermedades de los cerdos (Pereyra, 2009).

Candidatus Mycoplasma haematoparvum. Descripto por Sykes, Ball, Alguacil y Alevines en 2005. Su nombre deriva de hemato sangre y parvum pequeño. Fuente de infección: sangre de caninos infectados (Sykes et al., 2005). Hábitat: caninos infectados. Filogenia: asignación al grupo de hemoplasmas del grupo de neumonía de Mollicutes (Foley y Pedersen, 2001). Morfología celular: sin pared; De forma cocoide. Temperatura óptima de crecimiento: no aplicable. Estado de cultivo: no cultivable. Secuencia de acceso Nº AY854037.1111111 (Gen 16S rRNA).

1.2.2 Mecanismos de patogenicidad de los MH

Los nuevos conocimientos sobre las propiedades compartidas y divergentes y la patogenicidad de los hemoplasmas y otros micoplasmas mejorarán la comprensión de las enfermedades causadas por ambos grupos de organismos. Los MH son agentes etiológicos causales de anemia infecciosa en una variedad de animales. Los MH son pequeños parásitos eritrocíticos que se adhieren pero que en algunos casos pueden llegar a invadir; lo anterior se comprobó con la cepa M. suis 08/07 del MH del cerdo *Mycoplasma suis* (Groebel, 2009).

Una nueva especie de MH, llamado *Ca. M. haemohominis*, se informó recientemente en una persona y se asoció con síntomas clínicos de pirexia y anemia hemolítica (Steer, 2011). En cerdos la infección aguda por *M. suis* (anemia infecciosa en porcinos o AIP) se manifiesta como anemia hemolítica y diátesis hemorrágica acompañada de inmunomodulación y disfunción de la coagulación debido a la coagulación intravascular y posterior coagulopatía

(Felder, 2010; Zachary, 1985). Sin embargo, la coagulación intravascular diseminada no puede explicar completamente los signos clínicos de la infección por *M. suis*, por ejemplo, cianosis, hemorragia petequiral y equimosis. Una posibilidad es que las células endoteliales (CE) de la vasculatura estén involucradas en la patogénesis de la AIP.

Estudios de microscopía electrónica de los glóbulos rojos de cerdos infectados experimentalmente revelaron cambios morfológicos masivos, como la coagulación de la sangre en estos animales que se atribuyó a la producción de anticuerpos IgM e IgG autorreactivos fríos y calientes dirigidos contra la superficie de los glóbulos rojos (Felder K.M., 2011).

Hasta la fecha, varias bacterias patógenas, incluidas *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. gallisepticum*, *M. neurolyticum*, *Bartonella bacilliformis*, *Rickettsia conorii* y *Bacillus anthracis* se ha descrito que atacan y dañan la barrera endotelial o interactúan estrechamente con la CE desencadenando la respuesta inflamatoria y el proceso de coagulación. De esta manera, pueden interferir con la función protectora de las CE a través de una variedad de mecanismos, incluida la invasión y el daño endotelial que podría inducir a diátesis hemorrágica (Arias-Stella J., 1986; Valbuena G., 2003; Valdivieso-García A., 1989). Según evidencias, se consideró que los glóbulos rojos constituían la célula hospedadora exclusiva de *M. suis*. Pero se demostró que *M. suis* también interactúa estrechamente con las células endoteliales, lo que da como resultado la activación y destrucción endotelial. También se comprobó que es capaz de producir biofilms, y que ésta podría ser la forma en que consigue persistir en los organismos infectados sin poder detectarse. (Groebel, 2009). En definitiva la infección de *M. suis* provoca daño endotelial, la inducción de cascadas proinflamatorias e inflamatorias y otros procesos inmunomediados. Parece apropiado pensar que estos mecanismos podrían ser los mismos para otros MH, incluidos los que afectan al perro.

1.2.2.1 Enfermedades que producen los MH

Si bien, los mecanismos patogénicos propios de los hemoplasmas, todavía no están totalmente definidos, pueden causar anemia hemolítica aguda y diversas enfermedades crónicas en hospedadores vertebrados. El espectro clínico de la infección varía desde asintomático hasta potencialmente mortal, dependiendo parcialmente de la susceptibilidad del hospedador crónicas (Messick, 2004; Neimark, 2002; Pereyra, 2009).

Aproximadamente el 20% de los 10.000 cerdos analizados en un estudio tuvieron títulos positivos para *M. suis*, sin embargo, los títulos disminuyeron rápidamente y fueron insignificantes en los cerdos con infección crónica. Los signos clínicos de infección aguda en ovejas incluyen membranas mucosas pálidas o ictericas causadas por anemia hemolítica y disminución de la tolerancia al ejercicio. La enfermedad varía en gravedad y los brotes agudos en el rebaño suelen durar de 14 a 28 días. Diferentes cepas de *M. ovís* puede variar en su capacidad para causar enfermedades. Las infecciones crónicas por hemoplasma en animales, en las que se observa un número bajo o indetectable de MH en los frotis de sangre periférica, son bien reconocidas, y también hay otras presentaciones clínicas en otras especies animales, las cuales su descripción exceden al tema del presente trabajo.

Por último, cabe aclarar que en las enfermedades asociadas con la infección crónica, una exacerbación aguda y potencialmente mortal de la anemia hemolítica en los animales portadores puede ser activada por una enfermedad concurrente, estrés o inmunosupresión. Los animales infectados con hemoplasmas, incluso si se tratan con antibióticos eficaces, siguen siendo portadores crónicos después de que se hayan resuelto los signos clínicos (Pereyra, 2009; Steer et al., 2011).

1.2.3 Infección y enfermedad por MH en el perro

La amplia distribución de *M. haemocanis* está documentada en perros de diversos países. Cuando se observan frotis de sangre infectada, se vé que se presentan individualmente o en cadenas que pueden dividirse, dando como resultado una forma de Y; la cadena es a veces arqueada, produciendo una forma de arco de violín (Kikuth, 1928). En el perro, se han informado dos formas de infección por *M. haemocanis*. La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por anemia de rápido desarrollo, que se presenta con mayor frecuencia en perros inmunosuprimidos o esplenectomizados. Esta infección aguda también puede ser observada en perros no esplenectomizados que padecen coinfecciones como babesiosis, ehrlichiosis y septicemias por diferentes agentes. Los signos pueden incluir anorexia, letargo, pérdida de peso y fiebre (Messick, 2004).

Se ha informado anisocitosis, glóbulos rojos nucleados, esferocitos y policromasia en frotis de sangre y en ocasiones se han notificado trombocitopenias. También resultados positivos de la prueba de Coombs directa (Bundza, 1976; Donovan, 1960; Lumb, 1961). En algunos casos, la anemia hemolítica aguda puede provocar la muerte. Comúnmente, el perro se recupera de una enfermedad aguda pero permanece infectado crónicamente (Messick, 2003).

También se ha informado una forma crónica de infección en perros no esplenectomizados, que no produce signos clínicos definitivos. En esta forma de infección los parásitos se encuentran sólo periódicamente y en cantidades reducidas en la sangre periférica. La infección crónica se ha asociado con anemia leve, leucopenia y apatía en perros infectados experimentalmente (Messick, 2003).

Por otro lado, hay escasos informes de infección por *Ca. M. haemominutum* en el perro, y por lo tanto se desconoce la importancia de la infección. La infección suele ser subclínica y no se reconoce hasta que el bazo ha sido removido (Messick, 2003).

1.3 Prevalencia de la infección por MH en perros

En la revisión mundial, queda claro que la prevalencia se ajusta a las particularidades de los lugares donde fue estudiada. En América del Norte se ha demostrado que en perros existen los MH típicos que ya se describieron. Se analizaron muestras de sangre de 460 perros y 71 (15,4%) resultaron positivos; de ellos, 44 (9,6%) estaban infectados con *Ca. M. haemoparvum*, 15 (3,3%) estaban infectados con *M. haemocanis* y 12 perros (2,6%) resultaron infectados con ambos microorganismos (Kenny et al., 2004).

Al este de Sudán fueron analizados 78 perros buscando hemopatógenos y utilizándose métodos moleculares; así, 30 (38,5%) perros fueron positivos a un solo agente: 25 a *Ehrlichia canis*, 2 a *Anaplasma platys*, 1 a *M. hemocanis* y 2 a *Ca. M. haemoparvum*. Otro grupo de perros (48,7%) fueron positivos para dos o más de estos patógenos (Inokuma et al., 2006).

En cuanto a la prevalencia en zonas rurales de Brasil, se analizaron muestras de sangre de 132 perros, utilizando PCR en tiempo real: un total de 59/132 (44,7%) muestras de perros fueron positivas para MH (21 a *M. haemocanis* solo, 12 a *Ca. M. haematoparvum* solo y 21 a ambos) (da Costa Viera, 2015). En los dos estudios anteriores fueron comunes las coinfecciones.

Recientemente, en el sur de Francia, se informaron ensayos sensibles basados en PCR para los dos hemoplasmas caninos, *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum*. Al aplicar estos ensayos, el 15,4% de 460 perros, resultaron positivos (Wengi et al., 2008).

La prevalencia de *M. haemocanis* (5,6%) encontrada en perros de Grecia fue similar a estudios anteriores realizados en Francia. También se amplificaron con éxito muestras recogidas de 850 perros en Italia, España y Portugal, y 82 (9,6%) fueron PCR positivos para hemoplasmas caninos (43 a *M. haemocanis*, 34 a *Ca. M. haematoparvum* y 5 estaban coinfectados). La prevalencia de hemoplasma en la muestra fue significativamente mayor en Portugal (40%) que en Italia (9,5%) y España (2,5%). Se encontraron factores de riesgo de infección incluidos tales como edad joven, mestizaje e infección

por sarna. No se encontró asociación con anemia (Novacco et al. 2010).

Un trabajo comparativo de sangre de perros de Trinidad y Tobago y de Tanzania, resultó de la siguiente manera: 19 de las 100 muestras de Tanzania (19%) fueron positivas para *M. haemocanis* solo y 1 (1%) estaba doblemente infectado. De las 184 muestras restantes de Trinidad y Tobago, 9 (4,9%) fueron positivas para *M. haemocanis* solo, 5 (2,7%) para *Ca. M. haematoparvum* y 2 (1,1%) estaban infectados con los dos MH (Barker et al., 2010); lo anterior fue mayor que la prevalencia encontrada en Suiza en donde se recolectaron muestras de sangre durante un año de 889 perros: el 1.2% de los perros dieron positivos por PCR en tiempo real. El estado de infección no se asoció significativamente con anemia, edad o sexo. Los análisis filogenéticos de los MH indentificados, *Ca. M. haematoparvum* y *M. haemocanis*, revelaron una identidad $\geq 99,8\%$ con las secuencias conocidas (Wengi et al., 2008). En Reino Unido se amplificaron con éxito 227 muestras de sangre canina pero ninguna contuvo ADN de *M. haemocanis* o *Ca. M. haematoparvum* (Warman et al., 2010).

Se investigó la prevalencia en España para MH en un trabajo con 182 perros; se identificaron *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum*, con prevalencias del 14,3% y 0,6%, respectivamente. En estos perros, el sexo, la edad, el estado de salud, la presencia de anemia y la raza no fueron significativamente asociados con la infección por hemoplasmas, pero se encontró una asociación significativa entre la infección por hemoplasmas y vectores (Roura et al., 2010).

Al analizar la prevalencia de países con condiciones climáticas comparables se observaron prevalencias más bajas en climas más fríos y prevalencias más altas en climas más cálidos. Lo dicho reflejaría la importancia de los vectores en la transmisión de hemoplasmas. En climas más fríos, como en áreas de Suiza y el Reino Unido, esta garrapata no es endémica, mientras que en África subsahariana (este de Sudán y Tanzania) las altas temperaturas ambientales favorecen la continua replicación de este vector lo que conduce a altas tasas de prevalencia.

En un estudio reciente, *R. sanguineus* fue la garrapata más frecuente encontrada en perros infestados en el condado de Tesalónica, un área dentro

de Macedonia central (Papazahariadou et al., 2003). La influencia de las condiciones climáticas y por lo tanto de ese vector, no es tan clara para la prevalencia de *Ca. M. haematoparvum* para el cual podría existir por ejemplo un vector alternativo u otros factores. Por ejemplo, se ha demostrado que los perros enjaulados pueden tener un aumento de la infección por hemoplasmas en comparación con los perros de compañía mantenidos en hogar posiblemente debido a una mayor densidad de población con mezcla de individuos, menos vigilancia sobre el control de ectoparásitos y mayor probabilidad de mordeduras (Kemming et al., 2004a, Kemming et al., 2004b).

1.3.1. Prevalencia de infección de MH en humanos

Se ha estudiado sangre de personas de Carolina del Norte, Estados Unidos, con y sin contacto con artrópodos y ni animales domésticos, por PCR dirigida al gen de ARNr 16S para probar la infección por micoplasma hemotrópico. Particularmente la prevalencia de la infección por MH fue significativamente mayor en cohortes de veterinarios, técnicos veterinarios, cónyuges de profesionales veterinarios, personas con exposición extensa a artrópodos y/o contacto frecuente con animales (4,7%) comparado con una cohorte de pacientes examinados por reumatólogos debido a dolor articular crónico o evidencia de enfermedad de vasos pequeños (0,7%). Basado en la secuencia de análisis de ADN, una especie similar a *M. ovís* fue el organismo más prevalentemente detectado, también se encontró *Ca. M. haematoparvum* y además una especie de micoplasma hemotrófica potencialmente nueva, caracterizada de manera incompleta. La exposición histórica a animales y artrópodos vectores que pueden albergar *Mycoplasma* spp debiera ser considerado durante las investigaciones epidemiológicas y en la evaluación de pacientes individuales (Maggi et al., 2013).

Por otro lado, en la República Popular China las infecciones causadas por MH en los animales y los seres humanos han ido surgiendo en años recientes. Hasta la fecha el patógeno humano, que se observó con mayor frecuencia en China, no ha sido identificado genéticamente. Sin embargo, el potencial zoonótico de MH es evidente porque la enfermedad es más frecuente en los agricultores y los médicos veterinarios, que tienen mayor contacto con animales domésticos, que en aquellas en las que el contacto es infrecuente o

nulo. La transmisión vertical de la madre al feto es posible según algunos autores (Zhibiao et al., 2007). Los humanos infectados pueden ser asintomáticos o muestran diversos síntomas clínicos, que incluyen fiebre aguda, anemia e ictericia hemolítica grave. Las infecciones humanas fueron confirmadas por clínica y métodos de laboratorio (Hu et al., 2009).

2. Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

- Las infecciones por micoplasmas hemotróficos son frecuentes en perros, aunque en la mayoría de los casos se trata de infecciones asintomáticas.
- Los perros pueden ser infectados por micoplasmas hemotróficos de otras especies animales.
- Los perros pueden presentar coinfecciones con más de una especie de micoplasma hemotrófico.

2.2 Objetivo general

- Corroborar la presencia de MH en perros de la región (zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario).

2.3 Objetivos específicos

- Valorar los diferentes métodos de diagnóstico de laboratorio, directos y moleculares, para la detección de MH.
- Establecer asociaciones entre las variables ambientales y biológicas y la infección con MH en perros.
- Establecer la prevalencia de la infección por MH en poblaciones de perros de la región.
- Identificar las especies de MH que causan infección en los perros de la región.

3. Capítulo 3: MATERIALES y MÉTODOS (MyM)

3.1 Características de los animales del estudio. Procedencia geográfica, alojamiento, sexo, edad y raza

A continuación, se definen las variables utilizadas (excepto sexo) para caracterizar la población de perros estudiada en la investigación. Se tuvo en cuenta:

- **Procedencia geográfica:** se muestrearon perros de localidades del sur de la Provincia de Santa Fe (San Lorenzo, Chañar Ladeado, Roldán, Villa Constitución, Rosario, Carcarañá, Villa Mugueta, Fuentes, Totorasy Casilda) y sudeste de la Provincia de Córdoba (Isla Verde); dichas localidades se encuentran a distancias que varían entre los 20 y 200Km de la Ciudad de Casilda, tomada como centro ya que es donde se ubica la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, este área, ubicada en el centro geográfico de Argentina, constituyó la región del estudio.

- **Tipo de alojamiento o lugar donde habitaban los animales estudiados**
 - Refugio: instalaciones de acogida a animales sin hogar, perdidos o abandonados.
 - Criadero: instalaciones de cría de perros para su comercialización.
 - Domicilio: hogares con perros como mascotas familiares.

- **Edad:** Si bien existen variaciones en la edad de acuerdo a la raza, para la presente tesis se establecieron las siguientes categorías (franjas etarias):
 - cachorros: perros de 0 a 4 meses
 - jóvenes: perros de 4 meses a 1 año
 - adultos: perros de 1 a 7 años
 - gerontes: perros de 7 años en adelante

- **Raza:** Se clasificaron los animales en mestizos o con razas definidas.
 - Mestizo: perro, de ascendencia desconocida, con características de dos o más razas.
 - Raza definida: se consignó la raza cuando sus características se correspondían con una raza definida.

3.2 Recolección de muestras de sangre

3.2.1 Extracción de sangre de la vena marginal de la oreja (VMO)

En todos los perros se aplicó la técnica de punción de la VMO, muy utilizada en otras especies animales, principalmente en el cerdo. Anatómicamente la cara rostral del pabellón auricular está recorrida por las venas auriculares marginales, seleccionadas para realizar la punción (fotografía 2) con aguja de 16x5 (fotografía 3). Antes de realizar el procedimiento, se desinfectó la zona de modo quirúrgico con alcohol 96°, se ubicó la vena a punzar, se realizó una compresión manual en la base de la oreja para demorar el retorno venoso y favorecer así la ingurgitación de la vena. Una vez realizada la punción, se contactó la gota emergente con un portaobjetos limpio y desengrasado, evitando tocar la piel de la oreja con el mismo (fotografía 4). Finalmente, se realizó el extendido utilizando un portaobjetos expansor. Los portaobjetos (fotografía 5) se secaron a temperatura ambiente protegidos dentro de cajas de cartón para evitar el depósito de partículas de polvo ambiental u otro tipo de contaminación que pudiera dificultar la observación futura. Para su transporte, los portaobjetos se sujetaron sobre tapas de telgopor con cinta adhesiva de papel.



Fotografía 2: Cara rostral del pabellón auricular del perro, se observa la vena Media Otica y sus ramificaciones por efecto de la luz



Fotografía 3: Inciso punción con aguja 0,5mmx16mm para obtención de una gota gruesa para el frotis de sangre capilar periférica



Fotografía 4: El porta objetos se coloca sobre la gota gruesa para obtener una muestra de sangre



Fotografía 5: Extensión de la gota de sangre en el portaobjeto. A los efectos de lograr un frotis en capa fina, el extensor debe mantenerse en ángulo menor a 35°

3.2.2 Extracción de sangre de vena cefálica antebraquial (VCAB)

También se obtuvieron 5 ml de sangre de la VCAB de cada perro. Para la técnica, se realizó tricotomía con cuchilla Oster® N°40 para máquina Oster® a5, para corte de pelo quirúrgico. Luego se desinfectó con alcohol 96° y se aplicó manguito de goma por sobre la articulación húmero-radial, para demorar el retorno venoso y lograr la ingurgitación de la VCAB. Acto seguido se procedió a la venopunción con aguja 25x8. La sangre se recolectó de modo directo por extravasación del cono de la aguja, en un tubo de hemólisis estéril. Se utilizó EDTA como anticoagulante en una proporción de 1 gota (0,3 ml) cada 10ml de sangre, rotulado con cinta de papel adhesiva, identificando el paciente y su procedencia. Se aplicó algodón sujeto con cinta adhesiva en el brazo del paciente.

Tanto los extendidos resultantes de la punción de VMO y de la sangre obtenida de VCAB se tiñeron con la coloración hematológica de May-Grünwald-Giemsa (Schalm, 1981; Weiss, 2010; Servicio Central de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P., 2019. Apuntes sobre Hematología y Análisis Clínico, 2019; Cowell, 2020)

3.3 Recolección de ectoparásitos

Todos los perros fueron exhaustivamente inspeccionados, en búsqueda de ectoparásitos (Maggi and Kramer, 2019) como se describe en los siguientes 2 apartados.

3.3.1 Recolección de garrapatas

Para la extracción de garrapatas, se inspeccionó todo el cuerpo de cada perro incluyendo los espacios interdigitales y los pliegues de los pabellones auriculares.

Localizada la garrapata, y previo a su extracción, se aplicó sobre la misma un algodón embebido en alcohol de 96° por un minuto para facilitar el

desprendimiento.

Las garrapatas se extrajeron con uso de pinzas hemostáticas y mano izquierda. Para la conservación de los ejemplares así recolectados se utilizaron recipientes de 20ml de capacidad, con tapa a rosca, conteniendo alcohol 96°. Todos los ejemplares del mismo perro se colocaron en un mismo recipiente, (diferente del utilizado para las pulgas). Los colectores con garrapatas fueron rotulados con la identificación del paciente.

3.3.2 Recolección de pulgas

Para la recolección de pulgas se procedió al peinado con peine fino pasándolo suavemente por el manto a favor de pelo en la zona dorsal y laterales del cuerpo del perro, durante un tiempo de 10 minutos. El procedimiento se repitió tres veces por cada zona y el deslizamiento del peine se interrumpió para recolectar las pulgas en el momento de su visualización. Para facilitar la captura de las pulgas se aplicó antipulgafipronil tópico (Front Line®).

Las pulgas recolectadas se colocaron en recipientes de 20ml de capacidad con tapa a rosca, conteniendo alcohol 70° para la conservación de los ejemplares. Los colectores con pulgas fueron rotulados identificando el animal de procedencia.

Estos ectoparásitos fueron extraídos de los caninos utilizando peines finos de acero inoxidable. Se registraron las zonas de extracción dividiendo las distintas regiones del cuerpo del animal: cabeza, cuello, pecho, dorso, abdomen, axilas, miembros anteriores, miembros posteriores y espacio interdigital. Se contaron los especímenes recolectados en cada perro. Fueron observadas a ojo desnudo, bajo lupa estereoscópica y algunos estadios bajo microscopio óptico a menor aumento.

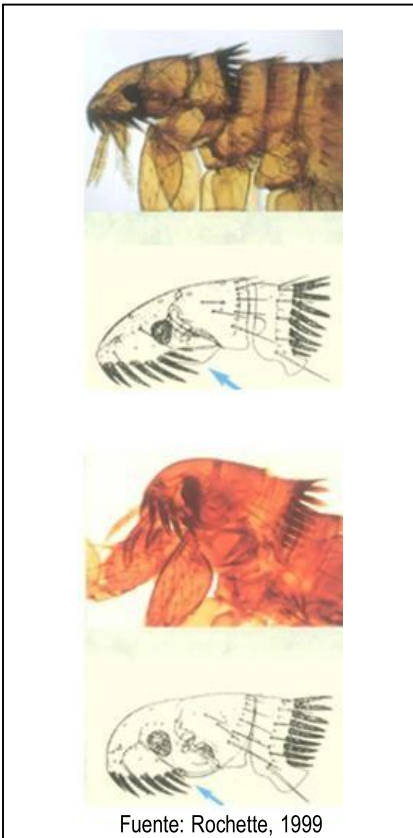
3.4 Identificación de ectoparásitos

Si bien la transmisión de MH, está relacionada a vectores hematógenos, no existe abundante información qué especies de pulgas y garrapatas se presentan en la región en estudio, por tanto, esa información resulta relevante.

3.4.1 Identificación de Pulgas

Las pulgas fueron observadas a ojo desnudo y bajo lupa estereoscópica. Para la identificación taxonómica se tuvo en cuenta la morfología de la cabeza y los ctenidiosgenal y pronotal. Se tuvo en cuenta básicamente la forma de la cabeza y la longitud de las espinas del ctenidiogenal. Es típico de varias especies la presencia de una serie de fuertes espinas similares a peines (ctenidios) encima de las piezas bucales (ctenidiogenal).

Entre las especies de pulgas *Ctenocephalides felis* y *C. canis* la diferencia más destacada es la forma y perfil de la cabeza siendo la de *C. canis* más convexa y circular que la *C. felis* tal como se observa en las fotografías y, en cuanto a los ctenidios, de la *C. felis*, en su peine de cabeza, la primera espina de la mejilla se vé casi como la segunda. En *C. canis*, la primera espina del peine de la mejilla posee un tamaño que es la mitad del segundo (fotografía 6 y fotografía 7). Esta fue la guía para la identificación.



Fotografía 6 Guía de identificación.

Pulga de gato: *Ctenocephalides felis*; observación a 50 x con peine de cabeza, mejillas y curvatura de la cabeza.

Ctenocephalides felis. Esquema del peine de cabeza, mejillas y curvatura de la cabeza.

Fotografía 7 Pulga de perro: *Ctenocephalides canis*; observación a 50 x con peine de cabeza, mejillas y curvatura de la cabeza.

Ctenocephalides canis Esquema del peine de cabeza, mejillas y curvatura de la cabeza

3.4.2 Identificación de Garrapatas

Para la identificación taxonómica se tomó como base la clave de identificación de Nava S. et al., 2017, teniendo así en cuenta presencia/ausencia de escudo, distribución de escudo, posición de piezas bucales, dimorfismo sexual, posición del surco anal, segundo segmento del palpo, forma de labase del capítulo, tamaño de palpos, tamaño de hipostoma y número de festones.

3.5 Detección de MH por métodos directos: búsqueda de estructuras compatibles con micoplasmas hemotróficos (ECMH)

Los frotis provenientes de la VMO, realizados durante el muestreo se fijaron con metanol absoluto durante 3 minutos; los frotis provenientes de la VCAB se realizaron en el laboratorio, previo a la tinción y no se fijaron sino que se colorearon directamente luego que se dejaron secar al aire.

La técnica utilizada para la coloración consistió en los siguientes pasos (adaptación, Piaton, 2015):

- Primer paso: se cubrieron los frotis con el colorante May Grünwald (Biopur) durante cinco minutos.
- Segundo paso: se agregó agua tamponada (estabilizador Biopur) sobre el colorante anterior sin lavar y se contabilizaron cinco minutos.
- Tercer paso: se lavó con agua de la canilla.
- Cuarto paso: se colocó el colorante de Giemsa (Biopur) diluido (1 gota de colorante por cada mililitro de estabilizador. Duración de la tinción: 10 a 30 minutos.
- Quinto paso: se lavó con agua de la canilla.

Los portaobjetos se secaron presionando con papel absorbente, sin frotar, y luego se observaron en microscopio.

3.5.1 Observación de frotis de sangre provenientes de VMO y VCAB

Los extendidos sanguíneos teñidos se observaron en microscopio óptico de campo claro a 1000X con objetivo de inmersión en aceite para detectar formas cocoides, bacilares o anillares en la periferia de los hematíes, a estas formas se las mencionará en adelante como estructuras compatibles con MH o ECMH.

En general los frotis se clasificaron como positivos (presencia de ECMH) o negativos (ausencia de ECMH), y sólo en un grupo de muestras, se utilizó una escala para clasificar la cantidad de ECMH observadas por campo microscópico; para las mismas se establecieron las categorías o niveles de

infección detallados en la tabla IV.

Tabla III: Categorías o Niveles de infección

Categorías de infección según la cantidad de ECMH a observar por campo microscópico (observación a 1000X):

Categorías	Nº de ECMH por campo microscópico (1000X)
I	Sin formas compatibles: ausencia de formas en 10 campos observados
II	Muy aislada cantidad: 1 a 2 estructuras en 6 campos
III	Aislada cantidad: 1 estructura cada 2 campos
IV	Regular cantidad: 1 estructura por campo
V	Moderada cantidad: 2 a 3 estructuras por campo
VI	Abundante cantidad: más de 3 estructuras por campo

3.6 Detección de micoplasmas hemotróficos por métodos moleculares

3.6.1 Extracción de ácidos nucleicos

3.6.1.1 Extracción de ácidos nucleicos (ADN) desde las muestras de sangre de VCAB

Se utilizó el kit de extracción de ADN de sangre y tejidos DNeasy® (Cat. N° 69504 y 69506) para obtener ADN de cada muestra de sangre extraída de la VCA.

Se procedió de acuerdo con el manual instructivo del kit (Westmoreland L.S.H. y col 2019; Westmoreland L.S.H., 2017; Fenimore A., 2011; Varanat M., 2009).

Todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (15-25°C), en microcentrífuga a 8000rpm por 2 o 3 segundos. Los Buffers AW1 y Buffer AW2 se diluyeron con el agregado de etanol según lo indicado. Antes de su uso se disolvió cualquier tipo de precipitado agitando suavemente los recipientes. Para iniciar se esperó a que la temperatura de reactivos y muestras de sangre se equilibren con la temperatura del ambiente. Se precalentó el baño térmico a 56°C antes de iniciar las actividades. Se siguieron los pasos subsecuentemente indicados para el caso de sangre no nucleada:

- Se dispensaron 200 μ l de cada muestra de sangre en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, luego se agregaron 20 μ l de proteinaSAK).
- Se añadieron 200 μ l de buffer AL y se mezcló con vórtex y se incubó la sangre con los agregados a 56 ° C durante 10 minutos.
- Se agregaron 200 μ l de etanol (96-100%). Se mezcló con vórtex.
- El contenido resultante se traspasó sobre una columna DNeasy Mini(para la captura del ADN) colocada en un tubo de recolección de 2 ml, el que se centrifugo a ≥ 6000 g (8000 rpm) durante 1 minuto; se desechó el flujo y el tubo de recolección.

- Se colocó luego la columna en un nuevo tubo de recuperación de 2 ml y se añadieron 500 µl de Buffer AW1; se centrifugó durante 1 minuto a ≥ 6000 g y nuevamente se desechó el flujo de centrifugación
- Se agregaron 500 µl de Buffer AW2 sobre la columna y se centrifugó durante 3 minutos a $20,000 \times g$ (14000 rpm); se desechó el flujo y el tubo de recolección.
- Se transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga y se eluyó el ADN agregando 200 µl de Buffer AE sobre la columna de captura; se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente (15-25° C) y se centrifugó durante 1 minuto a ≥ 6000 g obteniéndose así ADN de cada una de las muestras.

El ADN resultante se conservó en viales tipo Eppendorff con la misma identificación que la muestra de sangre original (DNeas y Blood&Tissue Handbook 07/2020).

3.6.1.2 Extracción de ácidos nucleicos (ADN) de pulgas y garrapatas

Luego de identificar las pulgas y clasificarlas en *C. canis* y en *C. felis*, se formaron pooles de por lo menos 5 pulgas de la misma especie (siempre que fue posible), éstos son pooles de 5 ejemplares de *C. felis* y pooles de 5 ejemplares de *C. canis*, sin perder la identificación de los perros de los cuales provenían. Con respecto a las garrapatas se unieron en un pool único por procedencia.

Es así que se formaron en Isla Verde 5 pooles de *C. canis*, 5 pooles de *C. felis* y un pool de *Rhipicephalus sanguineus*, en San Lorenzo 3 pooles de *C. felis* y un pool mixto de *C. canis* y *C. felis* (se hizo mixto para completar el número de 5 pulgas en total) y en Roldán 1 pool de *C. felis*. Cada pool fue identificado con un número.

Las garrapatas y pulgas de cada pool se trituraron al tamaño más pequeño posible, utilizando una hoja de bisturí número 23 y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, manteniendo siempre su identificación

(Buhler, 2020; Maggi, 2019; Maggi, 2010).

A cada tubo se le añadieron 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K, se mezcló por agitación en vórtex y se incubó a 56 ° C hasta lisis completa. Luego se repitieron los pasos del mismo modo que en el procesamiento de la sangre acorde al protocolo descrito en el punto 3.6.1.1.

3.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la detección de ADN de MH se utilizó PCR, amplificando una región específica del gen que codifica al 16SrRNA (Jarred J., 2018; Westmoreland L.S.H, 2017; Maggi R.G., 2013; Maggi R.G., 2013 a; Maggi R.G., 2013 b; Sykes J.E., 2010)

Para la prueba se utilizaron los siguientes cebadores.

- HemMycop16S-322s: 5' GCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGT 3'
- HemMyco16S-938as: 5' CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC 3'.

La amplificación se realizó utilizando una mezcla compuesta por 5 µl de cada ADN extraído en un volumen de 20 µl compuesto por 12,5 µl de Tak-Ex® Premix (Fisher Scientific), 0,2 µl de cada primer (IDT® DNA Technology) y 7,5 µl de agua de grado molecular. La reacción de amplificación fue realizada usando el siguiente perfil:

- a. desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C por un tiempo de 3 minutos (un ciclo).
- b. desnaturalización de ADN a 94°C por 15 segundos, hibridización 68°C por 15 segundos, y extensión a 72°C por 18 segundos (55 ciclos)
- c. un ciclo final de extensión a 72°C por 30 segundos.

Los productos obtenidos de cada muestra se analizaron por cromatografía en gel de agarosa al 2% usando luz ultravioleta; se incluyeron controles positivos y negativos y un patrón de peso molecular.

3.6.3 Secuenciación de los productos obtenidos en la reacción en cadena de la polimerasa

En todos aquellos casos en que las muestras de sangre fueron PCR positivas, se llevó a cabo la secuenciación directa del ADN para identificar los MH hasta el nivel de especie. Los productos obtenidos por PCR fueron secuenciados comparando las secuencias depositadas en el banco de datos de GenBank y en el banco de datos propiedad del Intracelular Pathogens Research Laboratory, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University (Westmoreland, 2016; O'Nion, 2015; Mascarelli, 2015; Mascarelli, 2015; Maggi, 2014).

Las secuencias de referencia para este estudio incluyeron los siguientes números de acceso de GenBank:

- AY529641 (*Mycoplasma haemocanis*)
- GQ129113 (*Ca. Mycoplasma haematoparvum*)
- NR_103930 y AB610849 (*Mycoplasma suis*)
- CP000848 (*Rickettsia rickettsii*).

Se compararon las secuencias de cada muestra positiva a PCR en la base de datos de GenBank usando la alineación local básica.

La herramienta de búsqueda y los datos de homología se generaron utilizando el programa AlignX (Vector NTI suite 11.5.1, Invitrogen Inc., EE. UU.)

3.7 Detección por métodos moleculares de otros agentes causantes de enfermedades vectoriales en sangre y ectoparásitos

3.7.1 Detección de otros agentes por PCR.

Utilizando el ADN ya extraído, en un grupo de 70 muestras de perros de cinco localidades: Isla Verde en Córdoba y San Lorenzo, Chañar Ladeado, Roldán y Villa Constitución en Santa Fe, se investigaron al mismo tiempo que los MH, un grupo de agentes causantes de enfermedades vectoriales (*Anaplasma platy*, *Babesia* spp, *Bartonellas* spp, *Borrelia* spp, *Ehrlichia* spp,

Francisella spp, y *Rickettsia* spp) (Westmoreland, 2019; Westmoreland, 2016; Messinger, 2017; Maggi, 2014; Maggi, 2013c; Breitschwerdt, 2011; Varanat, 2011).

Especies de los géneros *Anaplasma*, *Babesia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Francisella*, *Mycoplasma* y *Rickettsia* fueron buscados utilizando ensayos de PCR específicos con los siguientes cebadores:

Para *Bartonella* spp:

- BspplITS325s: 5' CCTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG 3'
- BspplITS1100as: 5' GAACCGACGACCCCTGCTTGCAAAGCA 3'

Para *Anaplasma* spp y *Ehrlichia* spp:

- GEPs: 5' CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA 3'
- GEPs: 5' CTTCTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCCYAYTG 3'

Nota: la región de 16SrRNA que se usa fue seleccionada para la detección de todas las especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Westmoreland, 2016; Mascarelli, 2015; Maggi, 2014; Breitschwerdt, 2014; Quirollo, 2014; Maggi, 2013c; Breitschwerdt, 2014; O'Nion, 2015).

Para Piroplasmas:

- Piroplasma18S-144s: 5' ACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA 3'
- Piroplasma18S-772r: 5' ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA 3'

3.7.2 Secuenciación de otros agentes causantes de enfermedades vectoriales detectadas por PCR

Se realizó la secuenciación directa de ADN para identificar las especies de los géneros de hematópatógenos buscados por PCR, teniendo como referencia a las secuencias correspondientes con los siguientes números de acceso al GenBank:

AY055469 (*Anaplasma phagocytophilum*); AF399916 (plataformas de *Anaplasma* spp); KU710803 (*Babesia vogeli*); AY618928 (grande sin nombre *Babesia* spp. "palma de coco"); AF271081 (*Babesia gibsoni*); NC_005956.1 (*Bartonella henselae* Houston I); AF369529 (*B. henselae* SA2); DQ059763 (*Bartonella vinsoniiberkhoffii* genotipo II); DQ059764 (genotipo *B. vinsonii berkhoffii III*); AF312490 (*Bartonella koehlerae*); AB896695 (*Bartonella clarridgeiae*); NC_007354 (*Ehrlichia canis*); NR_044747 (*Ehrlichia ewingii*); AY529641.

Las secuencias fueron comparadas a la base de datos GenBank usando la alineación local básica. La herramienta de búsqueda y los datos de homología se generaron usando el software AlignX (Vector NTI suite 11.5.1, Invitrogen Inc., EE. UU.)

3.8 Análisis estadístico

Dado un estimador para una variable estadística discreta binaria se definen dos valores asociados importantes: sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad indica la capacidad de una prueba para detectar la presencia de la enfermedad en sujetos efectivamente enfermos. Una prueba sensible se caracteriza por una baja proporción de falsos negativos.

La especificidad indica la capacidad de una prueba para detectar la ausencia de la enfermedad en sujetos efectivamente sanos. Una prueba específica se caracteriza por una baja proporción de falsos positivos.

Para poder estimar la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica debemos contar con un criterio para determinar si los individuos presentan o no infección por MH. En el caso que nos ocupa esa respuesta nos la da la PCR como prueba de referencia (Gold Standard) de alta especificidad y sensibilidad ya que detecta la presencia de ADN de los agentes que se investigan (MH).

Dos valores asociados a los anteriores son:

- El valor predictivo positivo de la técnica, es decir, la proporción de individuos con test positivos que están efectivamente enfermos.
- El valor predictivo negativo que indica la proporción de individuos con test negativo que no presentan la enfermedad

Por último, se puede calcular la razón de verosimilitud (likelihood ratio test) definida como la razón o cociente entre la probabilidad de observar un resultado en individuos con la condición en estudio (patología) y la probabilidad de obtener dicho resultado en individuos sin la condición (patología).

Es decir, ante un resultado positivo de la prueba, cuántas veces es más probable que ese individuo presente la patología. Si la razón de verosimilitud es de 3,2, por ejemplo, ello significa que un individuo con resultado positivo a la prueba tiene una probabilidad 3,2 veces mayor de tener efectivamente la patología que un individuo con un resultado negativo a la prueba.

La razón de similitud se calcula como: $RS = [\text{sensibilidad} / (1 - \text{especificidad})]$

La sensibilidad, la especificidad y la razón de similitud que vincula a ambas, son propiedades de la prueba, mientras que los valores predictivos, tanto positivo como negativo, son propiedades de la población bajo análisis. Decir que son propiedades de la prueba significa que son independientes de la

prevalencia de la condición bajo estudio en la población bajo estudio. Ello implica que si se llevan a cabo los cálculos precedentes en dos poblaciones con diferente prevalencia de la condición evaluada: la especificidad, la sensibilidad y la razón de similitud serán coincidentes mientras que los valores predictivos diferirán en una y otra población. Para los cálculos se utilizaron las siguientes fórmulas; se presentan primero las abreviaturas:

Sensibilidad: S

Especificidad: E

Verdaderos Positivos: VP

Falsos Negativos: FN

Falsos Positivos: FP

Valor Predictivo Positivo: VP+

Valor Predictivo Negativo: VP-

Razón de similitud: RS

- $S = [VP / (VP + FN)]$
- $E = [VN / (VN + FP)]$
- $VP+ = [VP / (VP + FP)]$
- $VP- = [VN / (VN + FN)]$
- $RS = [S / (1 - E)]$

Se calculó la S, la E, el VP+, el VP- y la RS para la prueba de microscopía, es decir la observación de extendidos coloreados a 1000 X, que discrimina a los casos en infectados [ECMH (microscopía) +] y no infectados [ECMH (microscopía) -] en base a la prueba de PCR.

El porcentaje de infección por MH a través de la PCR (PCR positiva) y la detección de diferentes especies de MH (secuenciación) se asoció con las variables de procedencia geográfica, alojamiento, edad, sexo, presencia de ectoparásitos y lesiones en piel utilizando la prueba de Chi-Cuadrado.

La prueba de Chi-Cuadrado es un procedimiento estadístico que determina si existe una diferencia significativa entre los resultados esperados y los observados en una o más categorías. Es una prueba no paramétrica que es utilizada para examinar las diferencias entre variables categóricas en la misma población; también puede utilizarse para validar o proporcionar un

contexto adicional para las frecuencias observadas. El test de Fisher es una prueba similar pero para un tamaño muestral más pequeño. Como se vé en **Resultados**, la idea básica de la prueba es comparar los valores de los datos reales que se esperarían si la hipótesis nula fuera cierta. De esta forma, se buscó determinar si una diferencia entre los datos observados y los esperados se debieron al azar, o a una relación entre las variables estudiadas.

La información se organizó en tablas de contingencia y se analizó con el test exacto de Fisher o con una prueba chi-cuadrado de independencia u homogeneidad según correspondiera (Bravo-Grau y Cruz Q, 2015).

4 Capítulo 4: RESULTADOS

4.1 Dinámica muestral. Procedencia geográfica, alojamiento, edad, raza y sexo de losperros muestreados.

Se estudiaron ciento sesenta y dos perros de la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario que incluye el sur de la provincia de Santa Fe y el Sudeste de la provincia de Córdoba.

Así, en un refugio de Isla Verde se muestrearon veintiseis individuos (dos cachorros mestizos machos; diecieis jóvenes mestizos, siete hembras y nueve machos; siete adultos mestizos, seis hembras y un macho, un geronte Galgo hembra).

En un criadero de la ciudad de San Lorenzo se estudiaron veinte perros mestizos (siete jóvenes, tres machos y cuatro hembras; un adulto hembra; doce gerontes, seis machos y seis hembras).

De un domicilio de la ciudad de Chañar Ladeado se obtuvieron muestras de dos perros hembras gerontes de razas Dálmata y Collie.

De otro criadero de la ciudad de Roldán se obtuvieron veinte muestras de perros (nueve hembras jóvenes, cinco Shitsu, tres caniches y una mestiza; seis adultos cinco hembras, un Shitsu, dos Caniches Toy, un Galgo, un Fila Brasileño

y un macho Gran Danés; cinco gerontes, cuatro hembras tres mestizas, una Cocker Spaniel y un macho Doberman)

En la ciudad de Villa Constitución se muestrearon tres perros adultos. Tres hembras mestizas con propietario, dos adultas y una cachorra.

En la ciudad de Rosario, se obtuvieron muestras de veintiún perros adultos alojados en un refugio (Instituto Municipal de Salud Animal, IMUSA). Catorce eran hembras: una raza Dogo argentino, un Bordercollie, un Dachshund, once mestizas, siete eran machos: uno de raza Dachshund, otro Galgo y cinco mestizos.

De un refugio (establecimiento municipal) para perros abandonados en la localidad de Carcarañá, se obtuvieron veinte muestras de doce hembras mestizas, una joven, nueve adultas, dosgerontes; y de ocho machos mestizos seis adultos y dos gerontes.

De domicilios ubicados en Villa Mugueta se obtuvieron muestras de nueve perros. Dos eran hembras mestizas jóvenes, dos hembras adultas mestizas, tres hembras gerontes (dos mestizas y un Caniche toy) y dos machos adultos mestizos.

En la localidad de Fuentes, se tomaron muestras de once perros, todos de domicilios, cinco eran hembras: una joven, dos adultas y una geronte mestizas y una adulta de raza Labrador; también seis machos mestizos, un cachorro, un joven y cuatro adultos.

En la ciudad de Totoras se muestrearon dos hembras alojadas en domicilios de raza Boxer, una adulta y una geronte.

En la ciudad de Casilda, se muestrearon veintiocho perros adultos: catorce hembras que incluían doce mestizas, una Caniche Toy y una Ovejero alemán y catorce machos de los cuales ochoeran mestizos, dos Ovejero alemán, uno Pointer, uno Bull dog francés y dos Labradores, todos alojados en domicilios.

En la tabla IV se presentan los datos sintetizados reuniéndose las variables y la composición de la muestra en estudio. Los datos de los perros se recolectaron en una ficha individual en la cual, además del tipo de alojamiento, raza, sexo y edad, se consignaron signos compatibles con anemia (palidez o ictericia en mucosas), estado del manto, estado nutricional, presencia de lesiones cutáneas y presencia de ectoparásitos. A cada perro se le extrajo una muestra de 4 ml de sangre de la vena cefálica antebraquial (VCAB) y se le realizó punción de la cara interna del pabellón auricular para realizar frotis in situ. Simultáneamente, se llevó a cabo la revisión clínica para la detección de ectoparásitos (pulgas y garrapatas), de lesiones cutáneas y de signos de anemia en mucosas (Vaden, 2011; Márquez Cortéz, 2015).

Tabla IV. Procedencia geográfica, alojamiento, edad, raza y sexo de los perros muestreados. Se muestra el detalle del total de los animales muestreados en las diferentes localidades en donde se trabajó, y aclara información sobre la naturaleza de las muestras.

Procedencia	Nº de perros	Alojamiento	Edad	Raza	Sexo
Isla Verde Córdoba	25	Refugio Domicilio	2 cachorros 16 jóvenes 7 adultos 1 geronte	26 mestizos 1 Galgo	14 hembras 12 machos
San Lorenzo Santa Fe	20	Criadero	7 jóvenes 1 adulto 12 gerontes	20 mestizos	11 hembras 9 machos
Chañar Ladeado Santa Fe	2	Domicilio	2 gerontes	1 Dálmata 1 Collie	2 hembras
Roldán Santa Fe	20	Criadero	9 jóvenes 6 adultos 5 gerontes	6 Shitsu 6 Caniche Toy 1 Galgo 1 Fila brasileño 1 Cockerspaniel 1 Doberman 4 mestizos	18 hembras 12 machos
Villa Constitución Santa Fe	3	Domicilio	1 cachorra 2 adultas	3 mestizas	3 hembras
Rosario Santa Fe	21	Refugio	21 adultos	16 mestizos 2 Dachshund 1 Dogo argentino 1 Border collie 1 Galgo	14 hembras 7 machos
Caracarañá Santa Fe	20	Refugio	1 joven 15 adultos 4 gerontes	2 mestizos	12 hembras 8 machos
Villa Mugueta Santa Fe	9	Domicilio	2 jóvenes 4 adultos 3 gerontes	8 mestizos 1 Caniche Toy	7 hembras 2 machos
Fuentes Santa Fe	11	Domicilio	1 cachorro 2 jóvenes 7 adultos 1 geronte	10 mestizos 1 Labrador	5 hembras 6 machos
Totoras Santa Fe	2	Domicilio	1 adulto 1 geronte	2 Boxer	2 hembras
Casilda Santa Fe	28	Domicilio	28 adultos	20 mestizos 1 Caniche 3 Ovejeros 1 Pointer 1 Bulldog 2 Labrador	14 hembras 14 machos

4.2 Lesiones dérmicas y ectoparasitosis en los animales muestreados

A continuación, para cada procedencia, se describen las lesiones de piel y la presencia de ectoparásitos.

En Isla Verde, de los veinticinco perros muestreados en el refugio, en veintitrés se hallaron ectoparásitos y en solo siete animales lesiones secundarias al rascado que incluyeron alopecia difusa, eritema retro auricular de disposición bilateral, depilación, hiperpigmentación e hiperqueratosis en dorsal del área lumbosacra y producción de caspa leve a intermedia. En diez de estos veinticinco animales se recolectaron pulgas y de uno de ellos, garrapatas.

En el criadero de San Lorenzo se observaron en todos los veinte perros signos cutáneos, como depilaciones difusas con eritema retroauricular de disposición bilateral, depilación más intensa con hiperpigmentación e hiperqueratosis en dorsal del área lumbosacra, y producción de caspa leve a intermedia; en los veinte perros en que se recolectaron pulgas, en general se constató un alto grado de infestación.

Del domicilio de Chañar Ladeado, se obtuvieron solo muestras de sangre ya que las dos perras no presentaban lesiones ni ectoparásitos.

Del criadero de Roldán se recuperaron pulgas sólo de cuatro de los veinte ejemplares; el perro de raza Fila brasilero presentó signos de sarpullido generalizado con piodermia leve.

Con respecto a los tres perros de domicilio de Villa Constitución, todos presentaron pulicosis pero en ninguno hubo lesiones de piel.

Tampoco se observaron lesiones de piel en los veintiún perros del refugio de Rosario; sí se recolectaron pulgas en nueve de ellos y solo uno de los perros presentó un cuadro de garrapatosis.

Un único perro del refugio de Carcarañá presentó lesiones compatibles con rascado, es decir eritema y alopecia marcada en zona retroauricular bilateral, pero cinco perros presentaban pulicosis, por lo que se recolectaron pulgas.

Los nueve perros de domicilio de Villa Mugueta no presentaban lesiones cutáneas, pero de dos de ellos se recolectaron pulgas, de uno garrapatas y de cuatro pulgas y garrapatas.

Cinco de los once perros de domicilio de Fuentes presentaron pulgas y dos de ellos conjuntamente garrapatas.

En la ciudad de Totoras las dos hembras adultas de raza Boxer no presentaban lesiones cutáneas y ni ectoparásitos.

Los veintiocho perros de Casilda presentaban signos cutáneos como depilaciones difusas con eritema retroauricular con disposición bilateral, depilación intensa con hiperpigmentación e hiperqueratosis en dorsal del área lumbosacra, y producción de caspa leve a intermedia, aunque de ellos no se recolectaron ectoparásitos.

4.2.1 Identificación de ectoparásitos.

En los veintitrés perros con pulicosis (23/26) de Isla Verde se identificaron las dos especies de pulgas que afectan a los perros: en todos los animales se identificó *C. felis* (23/23) y en diecinueve de ellos (19/23) también *C. canis*. Fue en esta población donde *C. canis* manifestó su mayor presencia. Además en siete de esos perros se detectó *R. sanguineus* junto a las dos especies de pulgas.

En los veinte perros parasitados de San Lorenzo, se hallaron en todos *C. felis* (20/20) y en cinco de ellos (5/20), conjuntamente con *C. canis*.

Los cuatro perros parasitados de Roldán (4/20) estaban infestados con *C. felis*.

En Villa Constitución, los tres perros presentaron pulicosis, pero no se realizó la identificación de las pulgas (no se pudieron conservar).

De los cinco perros con pulgas de Fuentes se encontró *C. felis* en cuatro, en uno de esos cuatro también *C. canis* (coinfestación) y en el restante *C. canis* y *R. sanguineus*.

En Rosario, ocho animales (8/21) presentaron *C. felis*, uno de estos ocho estaba infestado conjuntamente con *R. sanguineus*. Un noveno perro presentó *C. canis* junto a *Heterodoxus spiniger*.

De los perros estudiados en Villa Mugueta cinco (5/9) presentaron *C. felis* y tres de ellos también *R. sanguineus*; uno de los perros presentó *C. canis* y *R. sanguineus*, y otro solamente *R. sanguineus*.

De los cinco perros con ectoparásitos de Carcarañá, solo se pudieron identificar las pulgas de dos animales: uno presentaba *C. felis* y otro *C. canis*.

Finalmente puede decirse que el 43% de los perros muestreados presentaba ectoparásitos, predominando *C. felis* que afectó al 40% del total; mientras tanto *C. canis* se encontró en el 17% de los animales y *R. sanguineus* en el 9%.

En la Tabla V se detallan las oportunidades en las que fueron recolectados ectoparásitos en las distintas localidades, la presencia de diferentes especies de ectoparásitos encontradas y las coinfecciones halladas. Se ilustran con fotos de ambas especies de pulgas halladas y de ejemplares de macho y hembra de la única especie de garrapata obtenida de los perros (fotografías 8, 9, 10, 11 y 12).

Tabla V: Hallazgos de ectoparásitos en perros de diferentes localidades. Número de perros parasitados sobre el total muestreado para cada localidad y detalle de cuántos estaban parasitados con *C. felis*, con *C. canis* y con *R. sanguineus*.

Localidad	Número de perros con distintas especies de ectoparásitos			
	Parasitados/ Muestreados	<i>C. felis</i>	<i>C. canis</i>	<i>R. sanguineus</i>
Isla Verde	23/26	23	19	7
Chañar Ladeado	0/2	-	-	-
San Lorenzo	20/20	20	5	-
Roldán	4/20	4	-	-
Villa Constitución	0/3	-	-	-
Rosario	9/21	8	-	1
		-	1	-
Carcarañá	2/20	1	1	-
Villa Mugueta	7/9	5	-	3
		-	1	1
		-	-	1
Fuentes	5/11	4	1	1
		-	1	1
Totoras	0/2	-	-	-
Casilda	0/27	-	-	-
Total	70/162	65/162	29/162	15/162

Fotografía 7 Pulga de gato
(*Ctenocephalides felis*)



Fotografía 8 Pulga de perro
(*Ctenocephalides canis*)



Fotografía 9: Macho de garrapata *Ripicephalussanguineus*



Fotografía 10: Hembra de garrapata *Ripicephalussanguineus*



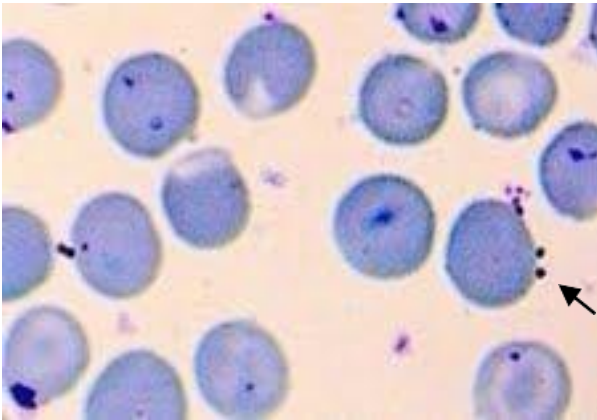
Fotografía 11: Comparación de tamaños entre macho y hembra de la garrapata *Ripicephalus sanguineus*



4.3 Detección de micoplasmas hemotróficos por métodos directos

4.3.1 Observación de ECMH en frotis de sangre periférica

Como se indicó en MyM se realizaron las punciones, los frotis y la lectura de los frotis teñidos con May Grünwald-Giemsa, en búsqueda de ECMH adheridos a los eritrocitos. Se consideró ECMH a toda forma cocoide o bacilar ubicada en la periferia de los glóbulos rojos.



Fotografía 12: Frotis teñido con May Grünwald Giemsa.

ECMH adheridos a los eritrocitos, observación a 1000x

Flechas indicando ECMH.

Salvo en las muestras de Chañar Ladeado, en todas las localidades se detectaron ECMH en los frotis sanguíneos observados. Los resultados por localidad de procedencia se detallan en la Tabla VI. El número total de muestras analizadas por microscopía en frotis de VMO fue de 135; no se pudieron analizar por este método los 162 perros totales.

Tabla VI: Detección de ECMH en frotis de sangre obtenidos de VMO en perros de diferentes procedencias.

Localidad	Total de muestras	ECMH	
		Observados	% de afectados
Isla Verde	26	17	65
San Lorenzo	20	20	100
Chañar Ladeado	2	0	0
Roldán	21	18	90
Villa Constitución	3	1	33
Rosario	21	10	48
Carcarañá	20	16	80
Villa Mugueta	9	1	11
Fuentes	11	5	50
Totoras	2	2	100
	135	90/135	67

4.3.2 Observación de ECMH en frotis de sangre de VCAB

De los perros estudiados; los porcentajes de infección presentaron las siguientes variaciones en las localidades muestreadas: San Lorenzo 100%, Roldán 86%, Isla Verde 65%, Fuentes 45%, Rosario 43%, Villa Constitución 33%, Villa Mugueta 11% y Chañar Ladeado 0%.

No se incluyeron los resultados de los frotis de Carcarañá, Casilda y Totoras que no pudieron leerse, por un deterioro del material en el transporte.

Tabla VII: Detección de ECMH en frotis de sangre de VCAB en perros de diferentes procedencias. Se detalla el número de frotis con ECMH (número de positivos) y porcentaje (%) de positivos (número de positivos en el total de muestras) por localidad.

Localidad	Total de muestras	Detección de ECMH	
		Número de positivos	% de positivos
Isla Verde	26	17	65
San Lorenzo	20	20	100
Roldán	21	18	86
Villa Constitución	3	1	33
Rosario	21	9	43
Villa Mugueta	9	1	11
Chañar Ladeado	2	0	0
Fuentes	11	5	45
	113	71	64

4.3.2.1 Comparación entre los resultados obtenidos en frotis de sangre de VMO y VCAB

Con el objetivo de establecer diferencias en la detección de ECMH entre sangre periférica de VMO y VCAB, se realizó un estudio comparativo con las muestras obtenidas de los perros de San Lorenzo y Roldán, es decir un total de 80 muestras, obtenidas de VMO y de VCAB de cada uno de los 40 perros (dos muestras por perro). Se utilizó la clasificación cuyos criterios se detallaron en el punto 3.5.1 de MyM.

Utilizando la escala de número de ECMH por campo, en un grupo de 27 perros las lecturas resultaron idénticas para ambas técnicas, en las muestras de seis perros la diferencia de lectura fue de un punto y en otros cinco perros la diferencia entre las dos técnicas fue de 2 puntos de la escala (Tabla VII). Debido a que las diferencias detectadas no fueron significativas, se decidió continuar a partir de aquí realizando solo frotis de VCAB y evitando la punción de la VMO.

En la tabla VIII se observan los resultados de la lectura según la escala

del número de ECMH (Categorías I a VI) en un grupo de cuarenta perros. Estos perros fueron exclusivamente los domiciliados en San Lorenzo y Roldán.

Tabla VIII: Comparación de resultados entre frotis de sangre de VMO y de VCAB

Detección de ECMH en frotis, perros de San Lorenzo			Detección de ECMH en frotis, perros de Roldán		
ID del perro	VMO	VCAB	ID del perro	VMO	VCAB
1	V	V	21	VI	V
2	II	IV	22	II	II
3	IV	IV	23	III	III
4	III	III	24	III	II
5	I	III	25	II	II
6	IV	IV	26	I	I
7	VI	VI	27	III	III
8	VI	VI	28	VI	V
9	VI	VI	29	III	III
10	VI	VI	30	VI	VI
11	VI	VI	31	II	II
12	VI	VI	32	VI	V
13	VI	VI	33	VI	VI
14	VI	IV	34	III	III
15	VI	IV	35	II	II
16	III	V	36	IV	IV
17	III	III	37	IV	III
18	IV	III	38	IV	III
19	V	V	39	I	I
20	VI	V	40	II	II

4.4 Detección de MH por métodos moleculares

4.4.1 Resultados de la PCR

4.4.1.1 Resultados de la PCR en sangre

El porcentaje general de infección por MH o de positivos a PCR, fue de un 48% (78/162).

En cada localidad el porcentaje de perros positivos fue: en Isla Verde se detectaron 20 de 26 (77%), en Chañar Ladeado 1 de 2 (50%), en San Lorenzo, 18 de 20 (90%), en Roldán, 13 de 21 (65%); en Villa Constitución, 2 de 3 (67%), en Fuentes 3 de 11 (27%), en Rosario 6 de 21 (29%), en Villa Mugueta 6 de 9 (44%), en Carcarañá 7 de 20 (35%), en Totoras ningún perro resultó positivo y en Casilda 4 de 27 (15%). Estos números se pueden apreciar en la tabla IX.

Tabla IX: Resultados de la PCR según procedencia geográfica.

Localidad	Total de Muestras	Nº de Positivos a PCR	Porcentaje de infección según PCR
Isla Verde	26	20	77
San Lorenzo	20	18	90
Chañar Ladeado	2	1	50
Roldán	21	13	62
Villa Constitución	3	2	67
Rosario	21	6	29
Carcarañá	20	7	35
Villa Mugueta	9	6	44
Fuentes	11	3	27
Totoras	2	-	-
Casilda	27	4	15
Totales	162	78	48

A continuación se agruparon las localidades de zonas rurales: Isla Verde, Chañar Ladeado, Fuentes, Carcarañá, Villa Mugueta, Totoras y Roldán (zona rural) y por otro lado las ciudades: San Lorenzo, Villa Constitución, Rosario y Casilda (zona urbana). Estos números se pueden apreciar en la tabla X.

Tabla X: Resultado de la PCR según procedencia de las muestras: zona urbana o rural. Se muestra el número de positivos y el porcentaje de infección a PCR para los perros muestrados de acuerdo a la procedencia de zona rural o urbana.

Localidad	Total de muestras	Positivos a PCR	Tipo de zona
Isla Verde	26	20	ZONA RURAL 50/91 55%
Chañar Ladeado	2	1	
Carcarañá	20	7	
Villa Mugueta	9	6	
Fuentes	11	3	
Totoras	2	-	
Roldán	21	13	
San Lorenzo	20	18	ZONA URBANA 30/71 42%
Villa Constitución	3	2	
Rosario	21	6	
Casilda	27	4	

4.4.1.1.1 Alojamiento y porcentaje de positivos a PCR

Considerando los perros alojados en refugios, de un total de 66, 33 resultaron positivos (50%). En los 55 perros provenientes de domicilios, 14 fueron positivos (25%). En el caso de los criaderos, de un total de 41 perros, 31 resultaron positivos (76%); tabla XI.

Tabla XI: Resultados positivos a PCR en los diferentes alojamientos según localidades

Localidad	Perros	Refugio	Domicilio	Criadero
Isla Verde	26	20/26	0/1	
San Lorenzo	20			18/20
Chañar Ladeado	2		1/2	
Roldán	21			13/21
Villa Constitución	3		2/3	
Rosario	21	6/21		
Carcarañá	20	7/13		
Villa Mugueta	9		4/9	
Fuentes	11		3/8	
Totoras	2		0/2	
Casilda	27		4/23	
Totales	162	33	14	31

4.4.1.1.2 Sexo y porcentaje de positivos a PCR

En Isla Verde, de los trece machos muestreados, diez (10/13) resultaron positivos (77%), e igual resultado se obtuvo en las trece hembras, En Chañar Ladeado de un total de dos hembras, una (1/2) resultó positiva (50%). En San Lorenzo de veinte perros estudiados nueve fueron machos resultaron todos (9/9) positivos (100%) y de las once hembras nueve (9/11) resultaron positivas (82%). De un total de veintiún perros, de Roldán, uno de los cuatro machos (1/4) resultó positivo (25%) y trece de las diecisiete (13/17) hembras fueron positivas (72%). Del total de tres perros en Villa Constitución, todas hembras, dos (2/3) resultaron positivas (67%). De la localidad de Fuentes de un total de once perros, seis machos uno resultó (1/6) positivo (17%) y de las cinco hembras dos (2/5) resultaron positivas (40%). En Rosario, de veintiún perros en total siete machos de los cuales dos (2/7) resultaron positivos (29%) y de las catorce hembras cuatro (4/14) resultaron positivas (29%). De los nueve perros de Villa Mugueta, las siete hembras cuatro (4/7) positivas (57%). De veinte perros estudiados en la ciudad de Carcarañá, de los ocho machos, tres (3/8) positivos (37%); de las doce hembras cuatro (4/12) positivas (33%).

En la ciudad de Casilda, de veintisiete perros muestreados, catorce machos dos (2/14) positivos (14%), de las trece hembras dos (2/13) positivas (15%).

Tabla XII: Resultados positivos a PCR de acuerdo al sexo y localidades.

Localidad	Total	Machos			Hembras		
		Nº	PCR positivos	%	Nº	PCR positivos	%
Isla Verde	26	13	10	77	13	10	77
San Lorenzo	20	9	9	100	11	9	82
Chañar Ladeado	2	-	0		2	1	50
Roldán	21	4	1	25	17	13	76
Villa Constitución	3	-	0	0	3	2	67
Rosario	21	7	2	29	14	4	29
Carcarañá	20	8	3	37	12	4	33
Villa Mugueta	9	2	0	0	7	4	57
Fuentes	11	6	1	17	5	2	40
Totoras	2	-	0		2	0	0
Casilda	27	14	2	14	13	2	15
Total	162	63	28	44	99	51	51

4.4.1.1.3 Raza y porcentaje de positivos a PCR

En Isla verde, veinticinco perros fueron mestizos y de ellos diecinueve (19/25), resultaron positivos (76%), uno solo de raza galgo (1/1) resultó positivo (100%). En Chañar Ladeado, las perras eran de razas definidas y una (1/2) resultó positiva (50%). Los veinte perros de San Lorenzo, fueron todos mestizos y dieciocho (18/20) resultaron positivos (90%). En la ciudad de Roldán de veintiún perros, dieciséis fueron de raza definida y once (11/17), resultaron positivos (65%), de los cuatro mestizos, dos (2/4) resultaron positivos (50%).

En Villa Constitución los tres perros estudiados fueron mestizos de los cuales dos (2/3) fueron positivos (67%). En Fuentes fueron estudiados once perros de los cuales diez eran mestizos y tres (3/10) resultaron positivos (30%) y uno de raza definida resultó negativo. De los veintiún perros estudiados en Rosario, diecisiete eran mestizos y de ellos cinco (5/17) fueron positivos (29%), de los cuatro de raza definida uno (1/4) resultó positivo (25%). En Villa Mugueta, de los ocho mestizos, tres (3/8) fueron positivos (37%); el perro de raza definida resultó (100%) positivo. De los veinte perros de Carcarañá, todos mestizos, de los cuales siete (7/20) fueron positivos (35%). De la ciudad de Totoras, dos perros de raza definida resultaron negativos. De la ciudad de Casilda los veintisiete perros eran mestizos de los cuales cuatro (4/27) resultaron positivos (15%).

Es decir, quince de veintiocho perros totales de razas definidas (54%) y sesenta y tres de ciento treinta y cuatro mestizos (47%) fueron positivos; tabla XIII.

Tabla XIII: Resultados positivos a PCR en perros según raza y localidad.

Localidad	Total de perros	Mestizos		Raza definida	
		PCR Positivo	% PCR Positivo	PCR Positivo	% PCR Positivo
Isla Verde	26	19/25	76	1/1	100
San Lorenzo	20	18/20	90	0/0	0
Chañar Ladeado	2	0/0	0	1/2	50
Roldán	21	2/4	50	11/17	65
Villa Constitución	3	2/3	67	0	0
Rosario	21	5/17	29	1/4	25
Carcarañá	7	7/20	35	0	0
Villa Mugueta	9	3/8	37	1/1	100
Fuentes	11	3/10	30	0/1	0
Totoras	2	0/0	0	0/2	0
Casilda	27	4/27	15	0	0
Total	162	63/134	47	15/28	54

4.4.1.1.4 Lesiones cutáneas y porcentaje de positivos a PCR

En Isla Verde de veintiséis perros, siete (7/26) presentaban lesiones, cutáneas y de esos siete, cuatro (4/7) fueron positivos (57%). En Chañar Ladeado, ninguno (0/2) de los dos perros presentó lesiones, y uno de ellos (1/2) resultó positivo (50%). De los veinte perros de San Lorenzo, todos (20/20) presentaron lesiones y dieciocho (18/20) de estos perros resultaron positivos (90%). En cuanto a la ciudad de Roldán, de los veintiún perros, hubo un solo perro (1/21) con lesiones que resultó positivo (100%) y veinte (20/21) no presentaron lesiones y de ellos doce (12/20) resultaron positivos (60%). De Villa Constitución, fueron tres perros, ninguno (0/3) con lesiones pero dos (2/3) resultaron positivos (67%). En la localidad de Fuentes, ninguno (0/11) de los once perros presentó lesiones; resultaron tres (3/11) positivos (27%). En la ciudad de Rosario, de veintiún perros ninguno (0/21) presentó lesiones y seis (6/21) fueron positivos (29%). En Villa Mugueta, los nueve perros estudiados no tenían lesiones (0/9) pero cuatro (4/9) fueron positivos (44%). De los veinte perros de Carcarañá, diecinueve (19/20) no presentaron lesiones de los cuales siete (7/19) resultaron positivos (37%); uno solo (1/1) presentó lesiones y resultó positivo (100%). En Totoras, hubo dos perros sin lesiones (0/2) y ambos fueron negativos (0/2). En la ciudad de Casilda, fueron veintisiete perros sin lesiones (27/27) y cuatro (4/27) resultaron positivos (15%).

De los veintinueve perros con lesiones veinticuatro resultaron positivos 83% (24/29) lo que representa el 15% (24/162) de la población en estudio.

De los ciento treinta y tres perros sin lesiones, cincuenta y dos resultaron positivos 39% (52/133); los resultados se muestran en la tabla XIV.

Tabla XIV: Resultados positivos a PCR en perros con y sin lesiones cutáneas en las diferentes localidades.

Localidad	Total de perros	Con lesiones cutáneas		Sin lesiones cutáneas	
		PCR Positivo	% PCR Positivo	PCR Positivo	% PCR Positivo
Isla Verde	26	4/7	57	16/19	84
San Lorenzo	20	18/20	90	0/0	0
Chañar Ladeado	2	0/0	0	1/2	50
Roldán	21	1/1	100	12/20	60
Villa Constitución	3	0/0	0	2/3	67
Rosario	21	0/0	0	6/21	29
Carcarañá	20	1/1	100	6/19	32
Villa Mugueta	9	0/0	0	4/9	44
Fuentes	11	0/0	0	3/11	27
Totoras	2	0/0	0	0/2	0
Casilda	27	0/0	0	4/27	15
Total	162	24/29	83	52/133	39

4.4.1.1.5 Ectoparasitosis y porcentaje de positivos a PCR

En Isla Verde, de los veintiseis perros con ectoparásitos, veinte (20/26) resultaron positivos (80%). De los dos perros de Chañar Ladeado, sin ectoparásitos (0/2), uno positivo. En cuanto a San Lorenzo, de los veinte perros, todos presentaron ectoparásitos (20/20), y dieciocho (18/20) resultaron positivos (90%). De la localidad de Roldán, cuatro perros (4/21) presentaban ectoparásitos, y dos (2/4) de ellos dieron positivos (50%), de los diecisiete sin ectoparásitos, once (11/17) resultaron positivos (65%). De los tres perros estudiados de Villa Constitución todos (3/3) presentaron ectoparásitos y sólo dos (2/3) fueron positivos (67%). En Fuentes, de once perros, cinco (5/11) con ectoparásitos dos (2/5) positivos (40%) y seis sin ectoparásitos de los cuales uno (1/6) resultó positivo (17%). De la ciudad de Rosario, de veintiún perros,

diez (10/21) presentaron ectoparásitos con dos (2/10) positivos (20%). De los once (11/21) sin ectoparásitos cuatro (4/11) dieron positivos (36%). En cuanto a Villa Mugueta, de nueve perros, siete(7/9) presentaron ectoparásitos de los cuales dos (2/7) resultaron positivos (22%), los dos (2/9) sin ectoparásitos resultaron positivos (22%). De los veinte perros de Carcarañá, cinco (5/20) presentaron ectoparásitos y de ellos dos (2/5) resultaron positivos (40%). De los quince que no presentaron ectoparásitos cinco (5/15) fueron positivos (33%). En Totoras, dos perros sin ectoparásitos resultaron ambos negativos. De la ciudad de Casilda, de los veintisiete perros ninguno presentó ectoparásitos, cuatro (4/27) positivos (15%).

En general, de los ochenta perros con ectoparásitos cincuenta (50/80) fueron positivos (63%) y de ochenta y dos perros sin ectoparásitos fueron ventiocho (28/82) positivos (34%). Todos los resultados se muestran en la tabla XV.

Tabla XV: Resultados de positivos a PCR en perros con y sin ectoparásitos en las diferentes localidades.

Localidad	Total de perros	Con ectoparásitos		Sin ectoparásitos	
		PCR Positivo	% PCR Positivo	PCR Positivo	% PCR Positivo
Isla Verde	26	20/26	80	0/0	0
San Lorenzo	20	18/20	90	0/0	0
Chañar Ladeado	2	0/0	0	½	50
Roldán	21	2/4	50	11/17	65
Villa Constitución	3	2/3	67	0/0	0
Rosario	21	2/10	20	4/11	36
Carcarañá	20	2/5	40	5/15	33
Villa Mugueta	9	2/7	29	2/2	100
Fuentes	11	2/5	40	1/6	17
Totoras	2	0/0	0	0/2	0
Casilda	27	0/0	0	4/27	15
Total	162	50/80	63	28/82	34

4.4.1.1.6 Edad y porcentaje de positivos a PCR

En Isla Verde, de los diecisiete perros jóvenes, catorce (14/17) fueron positivos (82%), de los ocho adultos, cinco (5/8) fueron positivos (63%) y el único (1/1) geronte fue positivo (100%). De Chañar Ladeado de los dos perros gerontes uno (1/2) positivo (50%). De los veinte perros de San Lorenzo, siete jóvenes (7/7) los cuales resultaron todos positivos (100%), doce gerontes de los cuales once (11/12) resultaron positivos (92%). En la localidad de Roldán, de veintiún, nueve jóvenes (7/9) de los cuales siete positivos (78%), de seis adultos cinco (5/6) positivos (83%), seis gerontes uno (1/6) positivo (17%). Villa Constitución, de tres perros dos (2/2) adultos que resultaron positivos (100%). En Fuentes, once perros, tres jóvenes los cuales dos (2/3) dieron positivos (67%) y de siete adultos uno (1/7) positivo (14%). De la ciudad de Rosario, de veintiún perros todos adultos, seis (6/21) resultaron positivos (29%). En la localidad de Villa Mugueta, dentro de los 9 perros, dos jóvenes uno (1/2) dio positivo (50%), cuatro adultos uno (1/4) positivo (25%), tres gerontes dos (2/3) resultaron positivos (67%). En Carcarañá, de los veinte perros, quince adultos de los cuales seis (6/15) resultaron positivos (40%), cuatro gerontes uno (1/4) positivo (25%). En tanto que, en Totoras, no hubo positivos. De la ciudad de Casilda, de los veintisiete perros adultos cuatro (4/27) resultaron positivos (15%).

En total, de los treinta y nueve jóvenes estudiados treinta y uno resultaron (31/39) positivos (79%), de noventa y tres adultos, treinta resultaron (30/93) positivos (32%) y de los treinta gerontes que participaron del estudio diecisiete (17/30) resultaron positivos (57%). Los resultados anteriores se muestran en la tabla XVI.

Tabla XVI: Resultados positivos a PCR en perros de diferentes edades según localidad.

Localidad	Total	Jóvenes		Adultos		Gerontes	
		PCR positiv	% PCR posit	PCR positiv	% PCR posit	PCR positiv	% PCR posit
Isla Verde	26	14/17	82	5/8	63	1/1	100
San Lorenzo	20	7/7	100	0/1	0	11/12	92
Chañar Ladeado	2	0/0	0	0/0	0	½	50
Roldán	21	7/9	78	5/6	83	1/6	17
Villa Constitución	3	0/0	0	2/3	67	0/0	0
Rosario	21	0/0	0	6/21	29	0/0	0
Carcarañá	20	0/1	0	6/15	40	¼	25
Villa Mugueta	9	½	50	1/4	25	2/3	67
Fuentes	11	2/3	67	1/7	14	0/1	0
Totoras	2	0/0	0	0/1	0	0/1	0
Casilda	27	0/0	0	4/27	15	0/0	0
Total	162	31/39	79%	30/93	32%	17/30	57%

4.4.1.1.7 Resultados de la PCR en pulgas y garrapatas

Como ya se mencionó, la PCR se aplicó también a las pulgas y garrapatas recolectadas. Los pools de las diferentes especies de pulgas de las diferentes localidades fueron agrupados por especies y analizados.

En Isla verde se conformaron cinco pools de *C. canis*, todos los cuales resultaron positivos (100%), cinco pools de *C. felis* de los cuales cuatro resultaron positivos (80%) y un pool de *R. sanguineus*, que resultó negativo. En San Lorenzo, de tres pools de *C. felis* uno (1/3) resultó positivo (33%) y otro constituido por *C. felis* y *C. canis* resultó negativo. El pool de *C. felis* obtenido de Roldán resultó negativo. De Fuentes un pool de *C. felis* resultó positivo y el pool de *R. sanguineus* no fue procesado. De Rosario, dos pools de *C. felis* resultaron positivos y dos pools de *R. sanguineus* no fueron procesados. En Carcarañá un pool de *C. felis* no fue procesado. Un (1/1)

pool de *C. felis* obtenido en Villa Mugueta dio positivo (100%).

Algunos pooles no se pudieron analizar porque las muestras no llegaron en condiciones al laboratorio de referencia siendo indicado con NR (no realizado).

En todos los pooles había ectoparásitos provenientes de perros positivos a PCR pero solo el 85% de los pooles resultó también positivo a esta prueba. Los resultados se muestran en la tabla XVII.

Tabla XVII: Resultados positivos a PCR en pooles de pulgas y garrapatas por localidad

Procedencia	Tipo y número de pooles	Pooles positivos	PCR	
			Resultado	%
Isla Verde	5 Pooles de <i>C. canis</i>	5/5	Positivo	100%
	5 Pooles de <i>C. felis</i>	4/5	Positivo	80%
	1 Pool de <i>R. sansanguineus</i>	1/1	Negativo	0%
San Lorenzo	3 Pooles de <i>C. felis</i>	1/3	Positivo	33%
	1 Pool de <i>C. felis</i> y <i>C. canis</i>	1/1	Negativo	0%
Roldán	1 Pool de <i>C. felis</i>	1/1	Negativo	0%
Rosario	2 Pooles de <i>C. felis</i>	2/2	Negativo	0%
	2 Pooles de <i>R. sanguineus</i>	-	NR	-
Carcarañá	1 Pool de <i>C. felis</i>	-	NR	-
Villa Mugueta	1 Pool de <i>C. felis</i>	1/1	Positivo	100%
Fuentes	1 Pool de <i>C. felis</i>	1/1	Positivo	100%
	1 Pool de <i>R. sanguineuss</i>	-	NR	-
Totales		17/20		85%

4.4.2 Resultados generales de la Secuenciación

Se identificaron las especies de MH en las muestras que habían resultado PCR positivas. En la Tabla XIII se expresa de manera general los totales de las especies obtenidas a partir de la secuenciación de las muestras positivas a MH.

Pudieron secuenciarse 65 ADN procedentes de 78 muestras positivas a PCR. En veintinueve muestras se detectó la especie *M. haemocanis* (45%), en dieciséis muestras se detectó *Ca. M. haematoparvum* (25%) y en ocho muestras se comprobó la presencia de *M. suis* (12%).

4.4.2.1 Resultados de la secuenciación en relación a la variable procedencia geográfica.

De las 65 muestras secuenciadas, en 29 se halló la especie *M. haemocanis* (45%), 16 de esas muestras contenían *Candidatus M. haematoparvum* (24%) y que sorprendentemente 8 coincidían con *M. suis* (12%).

En Isla Verde de un total de 16 muestras secuenciadas en doce se detectó MH y en cuatro *Ca. M. haematoparvum*. En San Lorenzo de las nueve muestras positivas, tres coincidieron con *M. haemocanis* y seis con *Ca. M. haematoparvum*. Del criadero de Roldán, de ocho muestras positivas en dos se detectó *M. haemocanis*, en dos *Ca. M. haematoparvum* y en dos *M. suis*. De la localidad de Rosario un perro resultó positivo a *Ca. M. haematoparvum* y dos a *M. suis*. De los cinco positivos de Villa Mugueta, uno resultó estar infectado con *Ca. M. haematoparvum* y tres con *M. suis*. En Carcarañá en los siete positivos el resultado fue la detección de *M. haemocanis* en cinco y *Ca. M. haematoparvum* en dos muestras. En Casilda resultó que de los cinco positivos tres coincidieron con *M. haemocanis* y dos tuvieron un resultado indeterminado, es decir que no se pudo definir la especie de MH.

Tabla XVIII: Resultados de la secuenciación por localidad.

En la tabla se expresa el número de muestras en la que se detectó cada una de las especies de MH y el porcentaje de positividad por especie en cada localidad y en total.

Localidad	Total muestras secuenciadas	Mhc		CaMpv		Ms	
		Número	%	Número	%	Número	%
Isla Verde	16	12/16	75	4/16	25	0/16	0
San Lorenzo	9	3/9	33	6/9	67	0/9	0
Chañar Ladeado	0	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Villa Constitución	2	2/2	100	0/0	0	0/0	0
Roldán	8	2/8	25	2/8	25	2/8	25
Rosario	10	0/10	0	1/10	10	2/10	20
Carcarañá	7	5/7	71	2/7	29	0/7	0
Villa Mugueta	5	0/5	0	1/5	20	3/5	60
Fuentes	3	2/3	67	0/30	0	1/3	33
Totoras	0	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Casilda	5	3/5	71	0/5	0	0/5	0
Totales y sus porcentajes	65	29/65	45	16/65	24	8/65	12

4.4.2.2 Resultados de la secuenciación vinculados al alojamiento

En una valoración de los alojamientos individualizados por localidad el resultado de la secuenciación fue el siguiente:

- **En los refugios:**
 - Isla Verde: de un total de dieciseis perros positivos a PCR, en la secuenciación resultaron ser doce (12/16) *M. haemocanis*, y cuatro (4/16) *Ca. Mycoplasma haematoparvum*.

- Rosario: de los diez positivos, uno (1/10) fue *Ca. M. haematoparvum* y dos (2/10) *Mycoplasma suis*.
 - Carcarañá: de los siete positivos en este refugio, cinco (5/7) resultaron *M. haemocanis* y dos (2/7) *Ca. M. haematoparvum*.
- **En los domicilios:**
 - Villa Constitución: de los dos positivos, ambos (2/2) resultaron *M. haemocanis*.
 - Fuentes: de los tres positivos dos resultaron *M. haemocanis* (2/3) y uno (1/3) *M. suis*.
 - Villa Mugueta: de los cinco positivos de esta localidad, uno (1/5) resultó *Ca. M. haematoparvum* y tres (3/5) *M. suis*.
 - Casilda: de los positivos hallados en esta ciudad, tres (3/5) resultaron *M. haemocanis* y dos (2/5) indeterminados.
 - **En los criaderos:**
 - San Lorenzo: de los nueve positivos resultaron, tres (3/9) *M. haemocanis* y seis (6/9) *Ca. M. haematoparvum*.
 - Roldán: de los ocho positivos en este criadero, resultaron dos (2/8) *M. haemocanis*, dos (2/8) *Ca. M. haematoparvum*, dos (2/8) *M. suis* y dos (2/8) indeterminados.

Al relacionar los resultados de la secuenciación con la variable alojamiento resultó que de un total de sesenta y cinco muestras secuenciadas se detectaron en refugios diecisiete perros (17/65) infectados con *M. haemocanis*, siete (7/65) *Ca. M. haematoparvum* y dos (2/65) con *M. suis*.

En los domicilios siete perros estaban infectados con *M. haemocanis*, ocho con *Ca. M. haematoparvum* y dos con *M. suis* y en criadero cinco presentaban *M. haemocanis*, ocho *Ca. M. haematoparvum*, dos *M. suis* y dos con especies indeterminadas. Como se puede apreciar en la tabla XIX, los refugios son los alojamientos con mayor grado de infección por MH.

Tabla XIX: Resultados de la secuenciación vinculados al alojamiento.

Se detalla para cada tipo de alojamiento el número y porcentaje de muestras infectadas con cada especie de MH.

Alojamiento	Total muestras secuenciadas	<i>M. haemocanis</i>		Ca.M. haematoparvum		<i>M. suis</i>	
		Número	%	Número	%	Número	%
Criadero	17	5/17	29	8/17	47	4/17	12
Domicilio	15	7/15	47	1/15	7	4/15	26
Refugio	33	17/33	52	7/33	21	2/33	6
Total	65	29	45	15	25	8	12

4.4.2.3 Resultados de secuenciación vinculados al sexo

Los resultados de la secuenciación teniendo en cuenta la variable sexo, arrojó como resultados generales que los machos y hembras sin considerar si estuvieron castrados o no.

De la localidad de Isla Verde resultó que de las veintiseis muestras secuenciadas, trece pertenecían a machos (13/26) y de las cuales, diez (10/13) fueron positivas (62%). De ellas seis (6/13) fueron positivas (46%) a *M. haemocanis* y dos (2/13) a *Ca. M. haematoparvum* (15%). De las trece hembras secuenciadas, siete (7/13) fueron positivas (54%) a *M. haemocanis* y dos (2/13) a *Ca.M. haematoparvum* (15%). En San Lorenzo, de un total de veinte muestras, de los nueve machos, uno (1/9) resultó positivo a *M. haemocanis* (11%) y dos (2/9) a *Ca.M. haematoparvum* (22%). En cuanto a las once hembras dos (2/11) a *M. haemocanis* (18%) y cuatro (4/11) a *Ca. M. haematoparvum* (36%). De la localidad de Roldán de los tres machos, uno de ellos (1/3) resultó positivo a *M. suis* (33%). De las dieciocho hembras secuenciadas, dos (2/18) resultaron infectadas por *M. haemocanis* (11%), dos (2/18) por *Ca. M. haematoparvum* (11%), una (1/18) por *M. suis* (5%). En Villa Constitución dos (2/3) de las 3 hembras hembras resultaron positivas a *M. haemocanis* (66%). En Fuentes se secuenciaron once muestras; de las mismas, seis de machos de las cuales uno (1/6) positivo a *M. haemocanis* (17%) y de las cinco hembras, una (1/5) dio positivo a *M. haemocanis* (20%) y la otra a *M. suis* (20%). De las veintiuna muestras estudiadas en la ciudad de Rosario, siete correspondieron a machos de los cuales uno (1/7) resultó positivo a *M. suis* (14%). En cuanto a las catorce hembras una

(1/14) dio positivo para *Ca. M. haematoparvum* (7%), otra (1/14) a *M. suis* (7%). De las nueve muestras de Villa Mugueta, los dos machos resultaron negativos mientras que una (1/7) hembra de las siete resultó positiva a *Ca. M. haematoparvum* (14%), tres (3/7) a *M. suis* (43%). En Carcarañá de las veinte muestras se estudiaron ocho, dos machos de los cuales (2/8) fueron positivos a *M. Haemocanis* (25%) y el otro (1/8) a *Ca. M. haematoparvum* (13%). De las doce hembras, se detectó en tres (3/12) *M. haemocanis* (25%) y en una (1/12) *Ca. M. haematoparvum* (8%). De la ciudad de Totoras se estudiaron dos hembras las cuales resultaron negativas. De la ciudad de Casilda con un total de veintisiete muestras, un macho (1/14) de los catorce dio positivo a *M. haemocanis* (7%) y de las trece hembras, tres (2/13) resultaron positivas a *M. haemocanis* (15%).

Los resultados de la secuenciación teniendo en cuenta la variable sexo, arrojó los resultados generales expresados en porcentajes que se ven en la tabla XX. Esta tabla ha sido dividida en 2 partes correspondientes a machos y hembras para una mejor visualización.

Tabla XX: Resultados de la secuenciación vinculados al sexo

Localidad	Total Muestra	Machos									
		Total Machos	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad		
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%	
Isla Verde	26	13	6/13	46	2/13	15	0/13	0	8/13	62	
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
S Lorenzo	20	9	1/9	11	2/9	22	0/9	0	3/9	33	
Roldán	21	3	0/3	0	0/3	0	1/3	33	1/3	33	
V. Constituc	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fuentes	11	6	1/6	17	0/6	0	0/6	0	1/6	17	
Rosario	21	7	0/7	0	0/7	0	1/7	14	1/7	7	
V. Mugueta	9	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0	
Carcarañá	20	8	2/8	25	1/8	13	0/8	0	3/8	37	
Totoras	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Casilda	27	14	1/14	7	0/14	0	0/14	0	1/14	14	
		62	11	18	5	8	2	3	18	29	

Localidad	Total Muestra	Hembras								
		Total hembras	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	13	7/13	54	2/13	25	0/13	0	9/13	69
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	
S Lorenzo	20	11	2/11	18	4/11	36	0/11	0	6/11	55
Roldán	21	18	2/18	11	2/18	11	1/18	5	5/18	28
V.Constituc	3	3	2/3	66	0/3	0	0/3	0	2/3	66
Fuentes	11	5	1/5	20	0/5	0	1/5	20	2/5	40
Rosario	21	14	0/14	0	1/14	7	1/14	7	2/14	14
V.Mugueta	9	7	0/7	0	1/7	14	3/7	43	4/7	57
Carcarañá	20	12	3/12	25	1/12	8	0/12	0	4/12	25
Totoras	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
Casilda	27	13	2/13	15	0/13	0	0/13	0	2/13	15
		100	19	19	11	11	6	6	37	37

4.4.2.4 Resultados de la secuenciación vinculados a la raza

Los resultados de la secuenciación teniendo en cuenta la variable raza, arrojaron los siguientes resultados generales. De un total de ciento sesenta y dos muestras, cincuenta y uno de los perros fueron de raza definida de los cuales dieciséis (16/51) resultaron positivos (31%). Los positivos respondieron a la siguiente proporción: uno (1/16) estaba infectado con *M. haemocanis* (6%); dos (2/16) con *Ca. M. haematoparvum* (13%) y tres (3/16) con *M. suis* (20%). De los ciento once mestizos, cincuenta resultaron positivos de los cuales veintinueve (29/50) estuvieron infectados con *M. haemocanis* (58%), catorce (14/50) con *Ca. M. haematoparvum* (28%) y cinco (5/50) con *M. suis* (10%).

De la localidad de Isla Verde resultaron quince (15/25) positivos (60%). De los perros mestizos, doce (12/15) resultaron positivas a *M. haemocanis* (75%) y tres (3/15) a *Ca. M. haematoparvum* (20%). Del perro de raza definida una a *Ca. M. haematoparvum* (100%). De Chañar Ladeado en ambas categorías resultaron negativos. De San Lorenzo, de los nueve perros mestizos positivos a PCR, tres (3/9)

resultaron *M. haemocanis* (33%) y seis (6/9) a *Ca. M. haematoparvum* (66%). De la localidad de Roldán, de los once positivos a PCR de raza definida, uno (1/11) resultó positivo a *M. haemocanis*(9%) y el otro (1/11) a *Ca. M. haematoparvum* (9%) y dos (2/11) resultó positivo a *M. suis* (18%). De los cinco perros mestizos resultaron dos (2/5) positivos (40%), uno (1/2) positivo a *M. haemocanis* (50%) y el otro (1/2) positivo a *Ca. M. haematoparvum* (50%). En Villa Constitución de los tres mestizos resultaron dos (2/3) positivos (66%), ambos positivos a *M. haemocanis* (100%). En Fuentes de los diez perros mestizos tres positivos a PCR (33%), dos (2/3) dieron positivo a *M. haemocanis* y uno (1/3) a *M. suis* (33%). De los perros positivos a PCR en la ciudad de Rosario seis perros mestizos resultaron positivos, uno de ellos (1/6) resultó positivo a *M. haemocanis* (17%), uno (1/6) a *Ca. M. haematoparvum* (17%), y dos (2/6) a *M. suis* (33%). De los cinco perros positivos de Villa Mugueta de los ocho mestizos, tres (3/8) resultaron positivos (38%) de los cuales uno (1/3) resultó positivo (1/3) a *Ca. M. haematoparvum* (33%) y dos (2/3) a *M. suis*. El único perro de raza definida uno (1/1) resultó positivo a MS (100%). En Carcaraña de los veinte mestizos resultaron siete (7/20) positivos (35%). De los mismos, cinco (5/7) fueron *M. haemocanis* (71%) y dos (2/7) *Ca. M. haematoparvum* (29%). De la ciudad de Totoras, los dos mestizos resultaron negativos. De la ciudad de Casilda, los 3 mestizos positivos, todos a *M. haemocanis* (100%). En la categoría mestizos, no se consideraron las particularidades de las razas participantes en las cruza estudiadas.

Los resultados anteriores se encuentran resumidos en la tabla XXI

Tablas XXI: Resultados de secuenciación vinculados a la raza

Localidad	Total Muestra	Mestizos								
		Total Mestizos	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	25	12/25	48	3/25	12	0/12	0	15/25	60
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
S Lorenzo	20	20	3/20	15	6/20	30	0/20	0	9/20	45
Roldán	21	5	1/5	20	1/5	20	0/5	0	2/5	40
V.Constituc	3	3	2/3	66	0/3	0	0/3	0	2/3	66
Fuentes	11	10	2/10	20	0/10	0	1/10	10	3/10	30
Rosario	21	17	1/17	6	1/17	6	2/17	12	4/17	24
V.Mugueta	9	8	0/8	0	1/8	12	2/8	25	3/8	38
Carcarañá	20	20	5/20	25	2/20	25	0/20	0	7/20	35
Totoras	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Casilda	27	3	3/3	100	0/3	0	0/3	0	3/3	100
		111	29	26	14	13	5	4	48	43

Localidad	Total Muestra	Raza definida								
		Total Raza definida	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	1	0/1	0	1/1	100	0/1	0	1/1	100
C. Ladeado	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
S Lorenzo	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Roldán	21	16	1/16	6	1/16	6	2/16	12	4/16	25
V.Constituc	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuentes	11	1	0/1	0	0/1	0	0/1	0	1/1	100
Rosario	21	4	0/4	0	0/4	0	0/4	0	0/4	0
V.Mugueta	9	1	0/1	0	0/1	0	1/1	100	1/1	100
Carcarañá	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Totoras	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
Casilda	27	24	0/24	0	0/24	0	0/4	0	0/24	0
		51	1	2	2	4	3	6	7	14

4.4.2.5 Resultados de secuenciación vinculados a la presencia de lesiones cutáneas

Los resultados de la secuenciación teniendo en cuenta la variable lesiones cutáneas, arrojó los siguientes resultados:

En la localidad de Isla Verde, de los siete perros con lesiones resultaron cuatro (4/7) positivos a *M. haemocanis* (57%), de los diecinueve sin lesiones doce (12/19) fueron positivos (63%), ocho (8/19) a *M. haemocanis* (42%) y cuatro (4/19) a *Ca. M. haematoparvum* (21%). En Chañar Ladeado ninguno de los dos perros presentaron lesiones.

En San Lorenzo todos presentaron lesiones. Nueve de ellos resultaron positivos definiendo los siguientes porcentajes, tres (3/20) resultaron positivos a *M. haemocanis* (15%) y seis (6/20) a *Ca. M. haematoparvum* (30%). De la localidad de Roldán, uno solo presentó lesiones y resultó *Ca. M. haematoparvum* (100%). De los sin lesiones resultaron cinco (5/20) positivos (25%), dos (2/12) *M. haemocanis* (17%), uno (1/12) *Ca. M. haematoparvum* (8%) y dos (2/12) a *M. suis* (17%). En Villa Constitución ninguno presentó lesiones resultando solo dos (2/2) positivas a *M. haemocanis* (100%). En Fuentes de los once perros ninguno presentó lesiones y solo tres (3/11) positivos a PCR (27%). Dos (2/3) dieron positivo a *M. haemocanis* (66%) y uno a *M. suis* (33%). De los perros positivos a PCR en la ciudad de Rosario, ninguno presentó lesiones y resultaron, uno (1/5) positivo a *Ca. M. haematoparvum* (20%) y dos (2/5) a *M. suis* (40%). De los cuatro perros positivos de Villa Mugueta, ninguno presentó lesiones, uno (1/4) resultó positivo a *Ca. M. haematoparvum* (25%) y tres (3/4) a *M. suis* (75%). En Carcaraña de los positivos uno solo (1/20) presentó lesiones (5%) y uno (1/1) resultó positivo a *Ca. M. haematoparvum* (100%). De los diecinueve sin lesiones seis (6/19) resultaron positivos (31%). Cinco (5/6) fueron *M. haemocanis* (83%) y uno (1/6) *Ca. M. haematoparvum* (17%). De Totoras ninguno presentó lesiones y ambos fueron negativos a PCR. De los veintisiete de la ciudad de Casilda ninguno presentó lesiones, tres (3/27) fueron positivos (11%) de los cuales tres (3/4) resultaron positivos a *M. haemocanis* (75%). Resultados en la tabla XXII.

Tablas XXII. Resultados de secuenciación vinculados a la presencia de lesiones cutáneas por localidad.

Localidad	Total Muestra	Con Lesiones								
		Total con lesiones	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	7	4/7	57	0/7	0	0/7	0	4/7	57
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
S Lorenzo	20	20	3/20	15	6/20	30	0/20	0	9/20	45
Roldán	21	1	0/1	0	1/1	100	0/1	0	1/1	100
V.Constituc	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuentes	11	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosario	21	0	-	-	-	-	-	-	-	-
V.Mugueta	9	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcaraña	20	1	0/1	0	1/1	100	0/1	0	1/1	100
Totoras	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Casilda	27	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		29	7	24	8	27	0	0	15	52

Localidad	Total Muestra	Sin Lesiones								
		Total sin lesiones	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	19	8/19	42	4/19	21	0/19	0	12/19	63
C. Ladeado	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
S Lorenzo	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Roldán	21	20	2/20	10	1/20	5	2/20	10	5/20	25
V.Constituc	3	3	2/3	66	0/3	0	0/3	0	2/3	66
Fuentes	11	11	2/11	18	0/11	0	1/11	9	3/11	27
Rosario	21	21	0/21	0	1/21	5	2/21	10	3/21	14
V.Mugueta	9	9	0/9	0	1/9	11	3/9	33	4/9	44
Carcaraña	20	19	5/19	26	1/19	5	0/19	0	6/19	32
Totoras	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
Casilda	27	27	3/27	11	0/27	0	0/27	0	3/27	11
		133	22	16	8	6	8	6	38	29

4.4.2.6 Resultados de secuenciación vinculados a la presencia de ectoparásitos por localidad

Los resultados de la secuenciación teniendo en cuenta la variable ectoparásitos, arrojó los siguientes resultados.

De la localidad de Isla Verde resultaron de losveintiséis perros todos con ectoparásitos siendo dieciseis los positivos (16/26) (61%) mientras que cuatro (4/20) a *Ca. M. haematoparvum* (20%). De la localidad de Chañar Ladeado ninguno tuvo ectoparásitos. De San Lorenzo resultaron nueve positivos (9/20) (45%), de los cuales tres (3/9) resultaron *M. haemocanis* (33%) y seis (6/9) *Ca. M. haematoparvum* (66%). De la localidad de Roldán, cinco (5/21) presentaron ectoparásitos (24%) de los cuales dos (2/5) resultaron positivos (40%) siendo uno (1/2) *M. haemocanis* (50%) y el otro *Ca. M. haematoparvum* (50%). De los otros dieciseis que no presentaron ectoparásitos cuatro (4/16) fueron positivos (25%), uno (1/16) *M. haemocanis* (6%), otro (1/16) *Ca. M. haematoparvum* (6%) y dos (2/16) a *M. suis* (12%). En Villa Constitución de las tres (3/3) (100%) perras con ectoparásitos, dos (2/3) resultaron positivas a *M. haemocanis* (66%). En Fuentes de los cinco perros que presentaron ectoparásitos resultaron dos (2/5) positivos (40%), uno (1/2) positivo a *M. haemocanis* (50%) y otro (1/2) a *M. suis* (50%). De los seis (6/11) (54%) que no presentaron ectoparásitos uno resultó (1/6) positiva a *M. haemocanis* (17%). De los diez perros (10/21) (48%) con ectoparásitos en la ciudad de Rosario uno (1/10) resultaron positivos (10%), uno (1/2) positivo y a *Ca. M. haematoparvum* (50%). De los once (11/21) que no presentaron ectoparásitos (52%) resultaron dos (2/11) positivos (18%) todos a (2/4) a *M. suis* (50%). De la localidad de Villa Mugueta, de los nueve perros seis (6/9) presentaron ectoparásitos (66%), de los cuales uno (1/6) resultó positivo a *Ca. M. haematoparvum* (17%). De los tres (3/9) que no presentaron ectoparásitos (33%), dos (2/3) positivos a *M. suis* (66%). En Carcarañá cinco (5/20) de los veinte perros presentaron ectoparásitos (25%) de los cuales dos (2/5) positivos (40%) uno (1/2) *M. haemocanis* (50%) y el otro (1/2) *Ca. M. haematoparvum* (50%). De los quince (15/20) sin ectoparásitos (75%), cinco (5/15) resultaron positivos (33%), cuatro de ellos (4/5) resultaron *M. haemocanis* (80%) y uno (1/5) *Ca. M. haematoparvum* (20%). De la localidad de Totoras, ninguno de los dos perros presentaron ni ectoparásitos ni hemopatógenos. De la ciudad de Casilda, veintitrés (23/27) de los veintisiete (85%) presentó ectoparásitos y cuatro (4/27) no presentaron (15%), de ellos tres (3/4) fueron

tres fueron positivos (75%) siendo todos (3/4) a *M. haemocanis* (75%). Se muestran los resultados en la tabla XXIII.

Tablas XXIII: Resultados de la secuenciación vinculados a la presencia de ectoparásitos por localidad

Localidad	Total Muestra	Con Ectoparásitos								
		Total con ectopara	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	26	12/26	46	4/26	15	0/26	0	16/26	62
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
S Lorenzo	20	20	3/20	15	6/20	30	0/20	0	9/20	45
Roldán	21	5	1/5	20	1/5	20	0/5	0	2/5	40
V.Constituc	3	3	2/3	66	0/3	0	0/3	0	2/3	66
Fuentes	11	5	1/5	20	0/5	0	1/5	20	2/5	40
Rosario	21	10	0/10	0	1/10	10	0/10	0	1/10	10
V.Mugueta	9	6	0/6	0	1/6	17	0/6	0	1/6	17
Carcaraña	20	5	1/5	20	1/5	20	0/5	0	2/5	40
Totoras	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Casilda	27	23	0/23	0	0/23	0	0/23	0	0/23	0
		103	20		14		1		35	34

Localidad	Total Muestra	Sin Ectoparásitos								
		Total sin lectos	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	0	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Ladeado	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
S Lorenzo	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Roldán	21	16	1/16	6	1/16	6	2/16	12	4/16	25
V.Constituc	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuentes	11	6	1/6	17	0/6	0	0/6	0	1/6	17
Rosario	21	11	0/11	0	0/11	0	2/11	9	2/11	18
V.Mugueta	9	3	0/3	0	0/3	0	2/3	66	2/3	66
Carcaraña	20	15	4/15	27	1/15	7	0/15	0	5/15	33
Totoras	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
Casilda	27	4	3/4	75	0/4	0	0/4	0	3/4	75
		59	9		2		6		17	29

4.4.2.7 Resultados de la secuenciación vinculados a la edad por localidad

Los resultados de la secuenciación teniendo en cuenta la variable edad de los perros muestreados, presentó los siguientes resultados; no todas las muestras PCR positivas se secuenciaron.

En la localidad de Isla Verde, de las veintiseis muestras totales diecisiete (17/26) de la categoría jóvenes (65%) se detectaron catorce (14/17) positivos (82%). De éstos, nueve (9/14) positivos a *M. haemocanis* (64%) y tres (3/14) a *Ca. M. haematoparvum* (21%). De los ocho adultos (8/26, 30%) resultaron cinco (5/8) positivos (62%), tres (3/5) a *M. haemocanis* (60%). Un único geronte (1/26; 4%) resultó infectado con *Ca. M. haematoparvum* (100%). De la localidad de Chañar Ladeado los dos perros fueron gerontes (100%), uno fue positivo a PCR (1/2) pero no se identificó.

De los veinte perros de San Lorenzo, siete (7/20) eran jóvenes (35%) y todos resultaron positivos (7/7; 100%), de los ellos uno (1/7) presentó *M. haemocanis* (14%) y cuatro (4/7) *Ca. M. haematoparvum* (57%); un adulto (1/20; 5%) resultó negativo; de la categoría gerontes (12/20; 60%) resultaron once (11/20) positivos (55%), dos (2/11) a *M. haemocanis* (18%), dos (2/11) a *Ca. M. haematoparvum* (18%) y siete no fueron secuenciados.

De los veintiun perros de la localidad de Roldán, nueve (9/21) eran jóvenes (43%) de los cuales cuatro (4/9) fueron positivos (44%), uno (1/4) a *M. haemocanis* (25%), otro (1/4) a *M. suis* (25%) y dos no se identificaron; de los siete (7/21; 33%) adultos resultaron cinco (5/7) positivos (71%), de ellos resultó uno (1/5) a *M. haemocanis* (20%), uno (1/5) a *Ca. M. haematoparvum* (20%) y dos no identificados. De los cinco gerontes (5/21; 24%) resultó uno (1/5) positivo (20%) a *Ca. M. haematoparvum* (100%).

En Villa Constitución las dos hembras adultas (2/3; 66%) resultaron positivas a *M. haemocanis* (100%). En Fuentes de los once perros, 3 eran jóvenes (3/11; 27%), de los cuales dos (2/11) fueron positivos (18%), de ellos uno (1/2) resultó infectado por *M. haemocanis* (50%) y el otro (1/2) por *M. suis* (50%); de los siete adultos (7/11; 64%), uno (1/7) solo resultó positivo

(14%) a *M. haemocanis* (100%). De los veintiún perros, todos adultos (100%), resultaron seis (6/21) positivos (28%) de los cuales en uno (1/6) se detectó *Ca. M. haematoparvum* (17%) y en dos (2/6) *M. suis* (33%).

En la localidad de Villa Mugueta, de los nueve perros dos (2/9) eran jóvenes (22%) siendo uno (1/2) positivo (50%) a *M. suis* (100%); de los cuatro (4/9) adultos (44%), uno (1/4) resultó positivo a *Ca. M. haematoparvum* (25%), de los tres gerontes (3/9; 33%) resultaron dos (2/3) positivos a PCR pero no se secuenciaron.

En Carcarañá de los veinte perros uno solo era joven (1/20; 5%) y negativo; de los quince adultos (15/20; 75%) seis (6/15) eran positivos (40%) y de ellos cinco (5/6) resultaron positivos a *M. haemocanis* (83%) y uno (1/6) a *Ca. M. haematoparvum* (17%); de los cuatro gerontes (4/20; 20%), solo uno (1/4) resultó positivo a *Ca. M. haematoparvum* (25%). De los dos perros de Totoras un adulto (1/2; 50%) y un gerente (1/2; 50%) fueron negativos.

De los veintisiete perros de la ciudad de Casilda, todos adultos, cuatro (4/27) resultaron positivos (15%), tres (3/4) a *M. haemocanis* (75%) y uno no se secuenció.

En ninguno de los casos se consideró la toma de muestras en perros lactantes ni se realizó una búsqueda dirigida a ninguna categoría etaria particular. Por razones de visualización se ha construido una tabla por cada una de las franjas etarias: jóvenes, adultos y gerontes.

Tabla XXIV: Resultados de secuenciación vinculados a la edad por localidad.

Localidad	Total Muestra	Jóvenes									
		Total jóvenes	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad		
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%	
Isla Verde	26	17	9/17	53	3/17	18	0/17	0	12/17	71	
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
S Lorenzo	20	7	1/7	14	4/7	62	0/7	0	5/7	71	
Roldán	21	9	1/9	11	0/9	0	1/9	11	2/9	22	
V.Constituc	3	1	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	
Fuentes	11	3	1/3	33	0/3	0	1/3	33	2/3	66	
Rosario	21	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
V.Mugueta	9	2	0/2	0	0/2	0	1/2	50	1/2	50	
Carcarañá	20	1	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	
Totoras	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Casilda	27	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
		40	12		7		3		22	55	

Localidad	Total Muestra	Adultos									
		Total adultoss	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad		
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%	
Isla Verde	26	8	3/8	40	0/8	0	0/8	0	3/8	38	
C. Ladeado	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
S Lorenzo	20	1	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	
Roldán	21	7	1/7	14	1/7	14	1/7	14	3/7	43	
V.Constituc	3	2	2/2	100	0/2	0	0/2	0	2/2	100	
Fuentes	11	8	1/8	14	0/8	0	0/8	0	1/8	12	
Rosario	21	21	0/21	0	1/21	5	2/21	10	3/21	14	
V.Mugueta	9	4	0/4	0	1/4	25	0/4	0	1/4	25	
Carcarañá	20	15	5/15	33	1/15	7	0/15	0	6/15	40	
Totoras	2	1	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	
Casilda	27	27	3/27	11	0/27	0	0/27	0	3/27	11	
		94	15		4		3		20	21	

Localidad	Total Muestra	Gerontes								
		Total gerontes	Mhc		CaMpv		Msu		Positividad	
			Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Isla Verde	26	1	0/1	0	1/1	100	0/1	0	1/1	100
C. Ladeado	2	2	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
S Lorenzo	20	12	2/12	17	2/12	17	0/12	0	4/12	33
Roldán	21	5	0/5	0	1/5	20	0/5	0	1/5	20
V.Constituc	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuentes	11	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosario	21	0	-	-	-	-	-	-	-	-
V.Mugueta	9	3	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
Carcarañá	20	4	0/4	0	1/4	25	0/4	0	1/4	25
Totoras	2	1	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
Casilda	27	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		28	2		5		0		7	25

Nota: La escasa proporción de muestras en cachorros generó su inclusión dentro de la categoría de jóvenes

4.5 Resultados de la investigación de otros patógenos causantes de enfermedades vectoriales

Este trabajo fue realizado con el objetivo claro de buscar micoplasmas hemotróficos en Argentina pero en esta búsqueda, aparecieron otros hemopatógenos en un total de 70 muestras, por tanto consideramos relevante su registro. Se comparó la frecuencia de infección entre los hemopatógenos investigados encontrándose que los MH son los más frecuentes.

Los hallazgos expresados en la tabla XXV aportan una evidencia más integral de la presencia de hemopatógenos en la región.

Tabla XXV: Comparación entre las infecciones por *Mycoplasma* spp y otros agentes de enfermedades vectoriales.

Localidad	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Mycoplasma</i> spp.
Isla Verde	3/24	2/21	1/22	20/24
San Lorenzo	8/20	2/20	0/20	18/20
Chañar Ladeado	0/2	0/2	0/2	1/2
Roldán	0/20	1/18	1/18	13/20
Villa Constitución	0/4	0/4	0/4	2/4
Prevalencia general	11/70	5/65	2/66	54/70
	15,7%	7,7%	3,0%	71,1%

En un grupo de setenta muestras secuenciadas, *Mycoplasma* spp. fue el más frecuente de los patógenos detectados e identificados por secuenciación de ADN con una prevalencia global del 77,1%. *Anaplasma* spp. fue detectado en 11 de las 70 (15,7%), *Bartonella* spp. y *Babesia* spp. en dos perros de los 70 totales.

La frecuencia de la especie identificada en cada género, la especie específica y prevalencia se detallan en la Tabla XXI. Brevemente, *Ca. M. haematoparvum*

(idéntico a *Ca. M. haematoparvum* GQ129113; 544/544 pb) se detectó con una prevalencia del 31,4%; *M. haemocanis* (idéntico a MHAY529641; 537/537 pb) con prevalencia del 48,6%; *M. suis* (idéntico a *M. suis* AB610849; 535/535 pb) del 2.9%; *B. clarridgeiae* (idéntico a *B. clarridgeiae* AB896695; 505/505 pb) en 1,5%; *Bartonella* sp. (con un 552/Homología de 582 pb con *Bartonella tribocorum* AF312505) del 1,5%; *B. vogeli* (idéntico a *B. vogeli* KU710803; 605 /605 pb) con una prevalencia de 7,7%, y *A. platys* (con 77 /79 pb de homología con *A. platys* AF399916) con prevalencia del 15,7%.

Las coinfecciones con dos o más patógenos también fueron identificadas: *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum* fueron detectados en el 5,7% de los perros (todos de Roldán, Santa Fe); *M. haemocanis* y *A. platys* encinco perros (7,1%), *Ca. M. haematoparvum* y *A. platys* en seis perros (8,6%), y *M. haemocanis* y *B. vogeli* en dos perros (3%). Todos los *A. platys* infectados los perros también se infectaron con *Mycoplasma* spp. (ya sea *M. haemocanis* o *Ca. M. haematoparvum*). No se obtuvo amplificación de *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp. o *Rickettsia* spp.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. En primer lugar se compararon los resultados obtenidos por métodos directos y por métodos moleculares para la detección de MH.

4.6.1 Comparación entre la detección de MH por métodos directos (microscopía) y por PCR

Tabla XXVI: Frecuencias absolutas de resultados positivos y negativos a microscopía y PCR

	PCR +	PCR -	Total
ECMH (microscopía) +	(a) 54 VP	(b) 36 FP	90
ECMH (microscopía) -	(c) 21 FN	(d) 15 VN	36
Total	75	51	126

En relación con la prueba de PCR, la microscopía tiene una S del 72%, una E del 29% y una RS de 1,014. Podemos decir que dicha relación revela que, la capacidad de la microscopía para detectar la presencia de la condición en aquellos sujetos que efectivamente la presentan (PCR+) es del 72%. Una prueba sensible se caracteriza por una baja proporción de falsos negativos que en este caso es del 16,67% (21/126).

La capacidad de la microscopía para detectar la ausencia de la condición en aquellos sujetos que efectivamente no la presentan (PCR-) es del 29%. Una prueba específica se caracteriza por una baja proporción de falsos positivos que en este caso es del 28,57% (36/126).

Con relación a la población estudiada puede decirse que:

- El VP+ de la microscopía es del 60%, es decir que del total de positivos a la microscopía un 60% presentan efectivamente la condición.
- El VP- es del 42%, valor que indica que ese porcentaje de individuos negativos a la microscopía no presentan realmente la condición evaluada.
- El valor 1,014 de la RS significa que un individuo con resultado positivo a la prueba tiene una probabilidad 1,014 veces mayor de tener efectivamente la condición investigada con respecto a un individuo con un resultado negativo a la prueba.

Es importante de destacar que el valor predictivo es dependiente de la muestra. Como la RS fue muy baja, se acepta que podría ameritar nuevos estudios ampliando el número de muestras.

4.6.2 Detección de MH por PCR en sangre y su asociación con diferentes variables

4.6.2.1 Asociación entre resultados positivos a la PCR y sexo

Valores hallados en cuanto al sexo (Test exacto de Fisher). Sobre un total de 162 muestras correspondientes a 62 machos y 100 hembras se plantea la hipótesis que la distribución de casos infectados (PCR+) y noinfectados (PCR-) es homogénea

entre sexos.

Tabla XXVII: Asociación entre resultados positivos a PCR y sexo

	Machos	Hembras	Total
PCR +	28	50	78
PCR -	34	50	84
Total	62	100	162

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: la distribución de casos positivos y negativos es homogénea en ambos sexos.

No se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p= 0,628$). El 45,16% de los machos (28/62) y el 50% de las hembras (50/100) dieron positivo a la prueba de PCR y el resto 40,48% (34/62) de los machos y 50% (50/100) de las hembras dieron negativo a la prueba de PCR. La diferencia es estadísticamente no significativa por lo que se concluye que el comportamiento de la condición evaluada es homogéneo entre sexos.

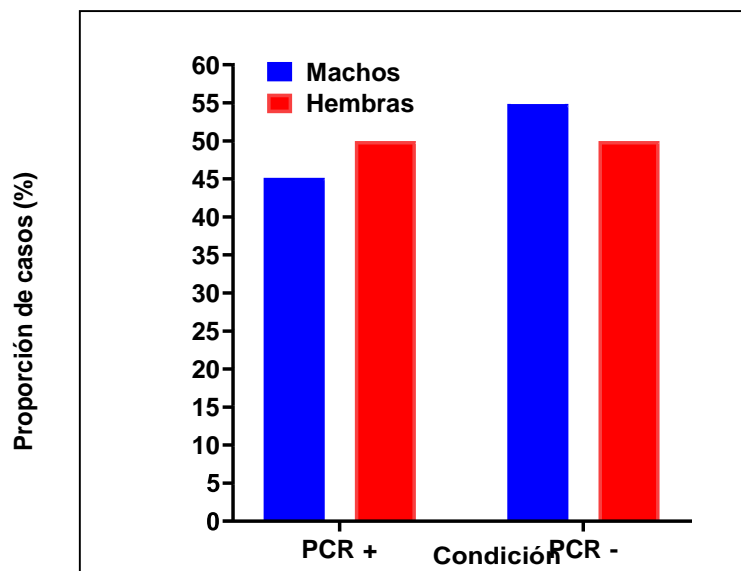


Gráfico 1
Asociación entre resultados positivos a PCR y sexo

4.6.2.2 Asociación entre resultados positivos a la PCR y presencia de lesiones de piel

Tabla XXVIII: Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de lesiones en piel.

	Con lesiones en piel	Sin lesiones en piel	Total
PCR+	28	50	78
PCR -	28	56	84
Total	56	106	162

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: La distribución de casos positivos y negativos es homogénea en sujetos con y sin lesiones en piel.

No se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p=0,744$).

El 50,0% de los casos con lesiones en piel (28/56) y el 47,2% de los casos sin lesiones en piel (50/106) dieron positivo a la prueba de PCR y el resto 50,0% (28/56) de los casos con lesiones y el 52,8% (56/106) de aquellos sin lesiones en piel dieron negativo a la prueba de PCR. La diferencia es estadísticamente no significativa por lo que se concluye que el comportamiento de la condición evaluada es homogéneo entre casos con y sin lesiones cutáneas.

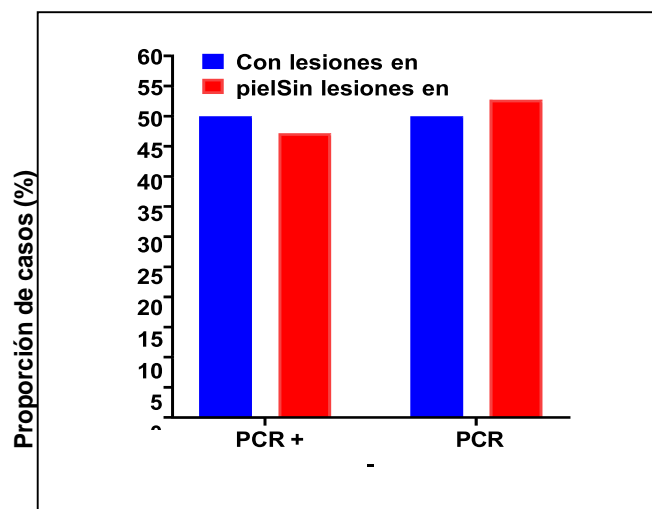


Gráfico 2
Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de lesiones en piel

4.6.2.3 Asociación entre resultados positivos a la PCR y presencia/ausencia de ectoparásitos

Asociación entre la presencia de infección (PCR+) o ausencia de infección (PCR-) y la presencia o ausencia de ectoparásitos (Test exacto de Fisher).

Tabla XXIX: Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de ectoparásitos

	Con ectoparásitos	Sin ectoparásitos	Total
PCR +	50	28	78
PCR -	30	54	84
Total	80	82	162

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: la distribución de casos positivos y negativos es homogénea en sujetos con y sin lesiones en piel. Se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p= 0,0005$).

El 62,5% de los casos con presencia de ectoparásitos (50/80) frente al 34,2% de los casos sin presencia de ectoparásitos (28/82) dieron positivo a la prueba de PCR. El 37,5% (30/80) de los casos con presencia de ectoparásitos y el 65,8% (54/82) de aquellos sin presencia de ectoparásitos dieron negativo a la prueba de PCR.

La diferencia es estadísticamente significativa por lo que se concluye que el comportamiento de la condición evaluada no es homogéneo entre casos con y sin presencia de ectoparásitos.

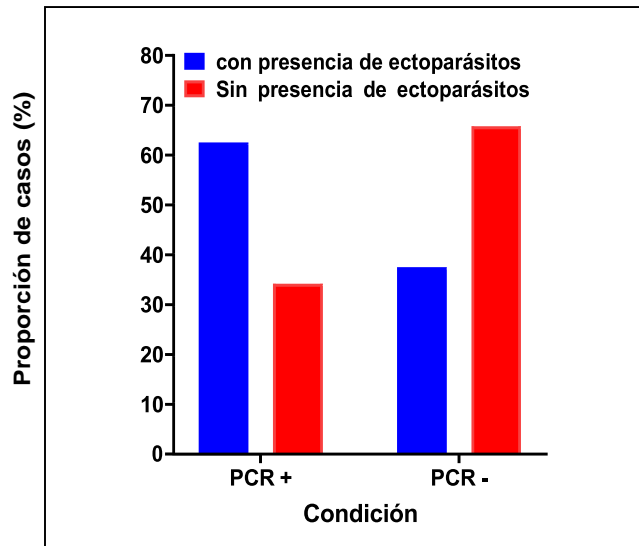


Gráfico 3

Asociación entre resultados positivos a PCR y presencia de ectoparásitos

4.6.2.4 Asociación entre resultados positivos a PCR y raza

Asociación entre la presencia de infección (PCR+) o ausencia de infección (PCR-) y la raza (Test exacto de Fisher). La gran variedad de razas y sus mestizos viene acompañada en general por una presunción que cuanto más puro es el linaje del animal, más susceptible a enfermedades. Por tanto realizamos el siguiente análisis.

Tabla XXX: Asociación entre resultados positivos a PCR y raza

	Raza definida	Mestizos	Total
PCR +	16	62	78
PCR -	12	72	84
Total	28	134	162

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: la distribución de casos positivos y negativos es homogénea en sujetos de raza definida y en mestizos. No se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p=0,308$).

El 57,1% de los individuos de raza definida (16/28) y el 46,3% de los mestizos (62/134) dieron positivo a la prueba de PCR. El 42,9% (12/28) de los individuos de raza definida y el 53,7% (72/134) de los mestizos dieron negativo a la prueba de PCR. La diferencia no es estadísticamente significativa por lo que se concluye que el comportamiento de la condición evaluada es homogéneo entre individuos de raza definida y mestizos.

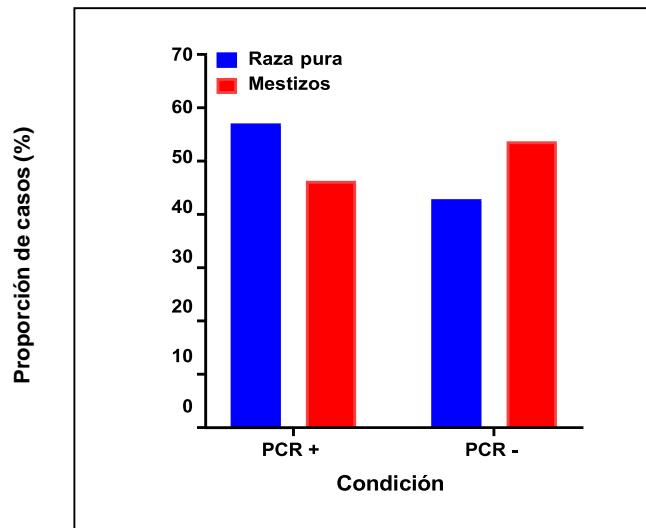


Gráfico 4
Asociación entre resultados positivos a PCR y raza

4.6.2.5 Asociación entre resultados positivos a PCR y alojamiento.

Asociación entre la presencia de infección (PCR+) o ausencia de infección (PCR-) con el alojamiento.

Tabla XXXI: Asociación entre resultados positivos a PCR y alojamiento

	Refugios	Criaderos	Domicilios	Total
PCR +	45	13	20	78
PCR -	20	7	57	84
Total	65	20	77	162

Prueba estadística: Chi-cuadrado

Hipótesis estadística: La distribución de infectados y no infectados es homogénea en sujetos diferentes procedencia. El 69,2% (45/65) de los casos procedentes de refugios, el 65,0% (13/20) de aquellos provenientes de criaderos y el 26,0% (20/77) de los derivados de domicilios dieron positivo a la condición evaluada frente al 30,8% (20/65), el 35,0% (7/20) y el 74,0% (57/77) con resultado negativo, respectivamente. La diferencia es estadísticamente significativa por lo que se concluye que el comportamiento de la condición evaluada no es homogéneo entre individuos de diferente procedencia, siendo menos frecuente en aquellos provenientes de domicilios.

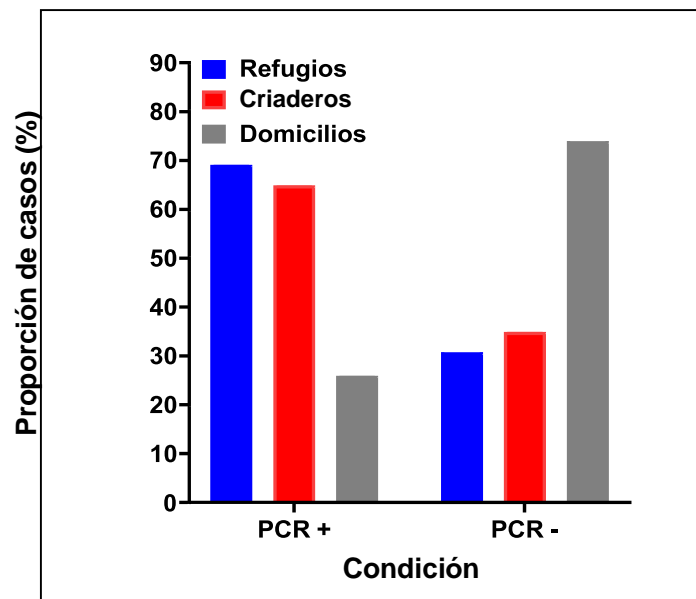


Gráfico 5

Asociación entre resultados positivos a PCR y alojamiento

4.6.2.6 Asociación entre resultados positivos a PCR y categoría etaria

Asociación entre la presencia de infección (PCR+) o ausencia de infección (PCR-) de la condición y categoría etaria. Es presumible que a mayor edad mayor posibilidad de contacto con vectores y agentes infecciosos, por lo que se indaga si realmente se da esta condición con mayor prevalencia a medida que avanza la edad en los perros

Tabla XXXII: Asociación entre resultados positivos a PCR y edad

	Jóvenes	Adultos	Gerontes	Total
PCR +	32	28	17	77
PCR -	11	58	12	81
Total	43	86	29	158

La categoría cachorros presentó un muy bajo número de MUESTRAS por lo que se excluyó del análisis.

Prueba estadística: Chi-cuadrado

Hipótesis estadística: La distribución de casos positivos y negativos es homogénea en sujetos de diferente categoría etaria. Se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p < 0,0001$).

El 74,4% (32/43) de los jóvenes, el 32,6% (28/86) de los adultos y el 58,6% (17/29) de los gerontes dieron positivo a la condición evaluada frente al 25,6% (11/43), el 67,4% (58/86) y el 41,4% (12/29) con resultado negativo, respectivamente. La diferencia es estadísticamente significativa por lo que se concluye que el comportamiento de la condición evaluada no es homogéneo entre individuos de diferente categoría etaria.

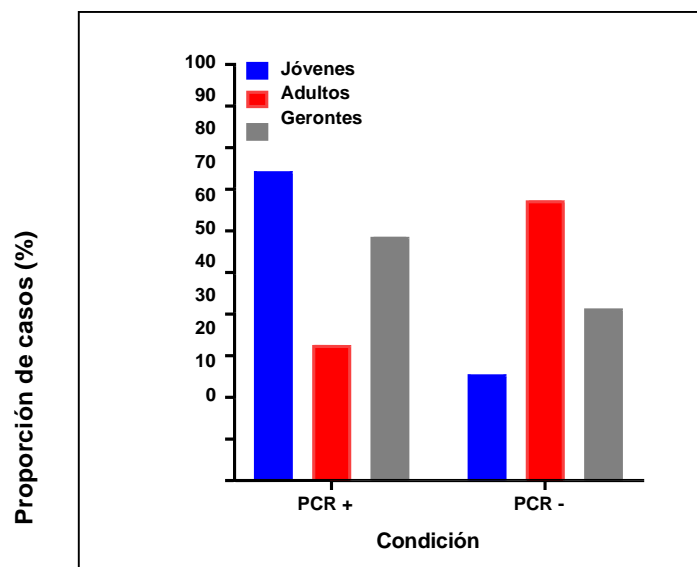


Gráfico 6
Asociación entre resultados positivos a PCR y edad

4.6.3 Asociación entre especies de MH y diferentes variables

Se buscaron también asociaciones entre especies de MH y diferentes variables.

4.6.3.1 Asociación entre *Mycoplasma haemocanis* y la presencia de ectoparásitos

En primer lugar, se estudió la infección por *Mycoplasma haemocanis* y la presencia de ectoparásitos. Asociación entre la positividad o negatividad a *M. haemocanis* y la presencia o ausencia de ectoparásitos (Test exacto de Fisher).

Tabla XXXIII: Asociación entre la infección por *M. haemocanis* y presencia de ectoparásitos

	Con ectoparásitos	Sin ectoparásitos	Total
<i>M. haemocanis</i> +	20	9	29
<i>M. haemocanis</i> -	30	52	82
Total	50	61	111

Prueba estadística: Test exacto de Fisher.

Hipótesis estadística: La distribución de casos positivos y negativos a *M. haemocanis* es homogénea en sujetos con y sin ectoparásitos.

Se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p = 0,0043$).

El 40% de los individuos con ectoparásitos fueron *M. haemocanis*+ (20/50) frente al 14,8% de los individuos sin ectoparásitos (9/61). El 60,0% (30/50) de los individuos con ectoparásitos y el 85,3% de aquellos sin ectoparásitos (52/61) estaban infectados con *M. haemocanis*. La diferencia es estadísticamente significativa por lo que se concluye que la positividad o negatividad a *M. haemocanis* no es homogénea entre individuos con y sin ectoparásitos.

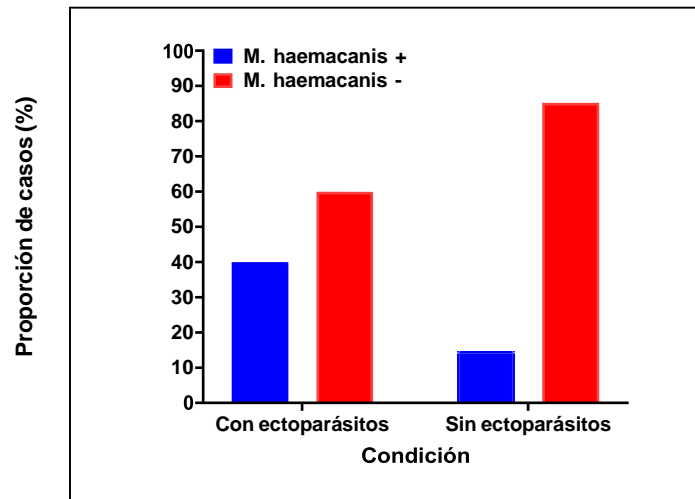


Gráfico 7

Asociación entre *M. haemocanis* y presencia de ectoparásitos

4.6.3.2 Asociación entre diferentes especies de *Mycoplasmahaemocanis* y la presencia de lesiones en piel

También se buscó asociación entre e *M. haemocanis* y lesiones de piel. Asociación entre la positividad o negatividad a *M. haemocanis* y la presencia o ausencia de lesiones en piel (Test exacto de Fisher).

Tabla XXXIV: Asociación entre *M. haemocanis* y presencia de lesiones en piel.

	Con lesiones en piel	Sin lesiones en piel	Total
<i>M. haemocanis</i> +	10	19	29
<i>M. haemocanis</i> -	28	55	83
Total	38	74	112

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: La distribución de casos positivos y negativos a *M. haemocanis* es homogénea en sujetos con y sin lesiones en piel.

No se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p= 0,999$).

El 26,3% de los individuos con lesiones en piel (10/38) y el 25,7% de los individuos sin lesiones en piel (19/74) fueron *M. haemocanis*+ frente al 73,7% de los individuos con lesiones en piel (28/38) y el 74,3% (55/74) de los individuos sin

lesiones en piel que fueron *M. haemocanis*. La diferencia es estadísticamente no significativa por lo que se concluye que la positividad o negatividad a *M. haemocanis* es homogénea entre individuos con y sin lesiones en la piel.

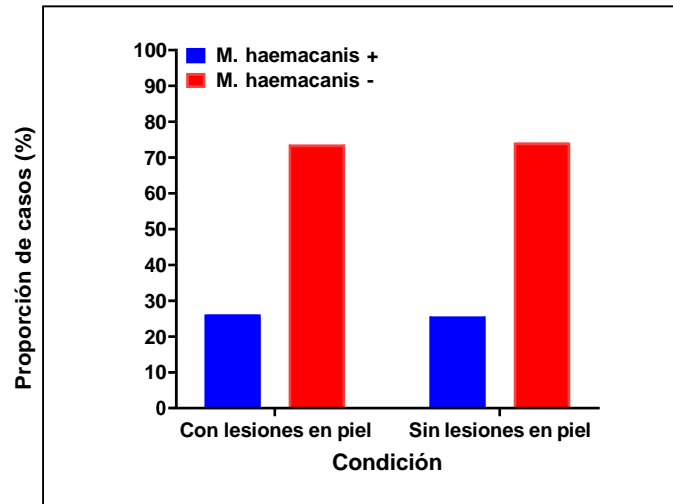


Gráfico 8
Asociación en *M. haemocanis* y lesiones en piel

4.6.3.3 Asociación entre *Ca. M. haematoparvum* y presencia de ectoparásitos

Habiendo realizado la asociación de *M. haemocanis*/ectoparásitos se practicó también con *Ca. M. haematoparvum*. Las diferentes especies que hoy están apareciendo en las ciudades argentinas testeadas, obliga a profundizar de modo individual, evitando generalizaciones. Asociación entre la positividad o negatividad a *Ca. M. haematoparvum* y la presencia o ausencia de ectoparásitos (Test exacto de Fisher).

Tabla XXXV: Asociación entre infección por *Ca. M. haematoparvum* y presencia de ectoparásitos.

	Con ectoparásitos	Sin ectoparásitos	Total
<i>Ca. M. haematoparvum</i> +	14	2	16
<i>Ca. M. haematoparvum</i> -	29	55	84
Total	43	57	100

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: La distribución de casos positivos y negativos a *Ca. M. haematoparvum* es homogénea en sujetos con y sin ectoparásitos

Se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p= 0,0001$). El 32,6% de los individuos con ectoparásitos fueron positivos a *Ca. M. haematoparvum*+ (14/43) frente al 3,5% de los individuos sin ectoparásitos (2/57). El 67,4% (29/43) de los individuos con ectoparásitos y el 96,5% de aquellos sin ectoparásitos (55/57) fueron *Ca. M. haematoparvum*-. La diferencia es estadísticamente significativa por lo que se concluye que la positividad o negatividad a *Ca. M. haematoparvum* no es homogénea entre individuos con y sin ectoparásitos. Si bien no hubo asociación con ectoparásitos para *M. haemocanis* pero sí se halló relación entre la infección por para *Ca. M. haematoparvum* y la presencia de ectoparásitos.

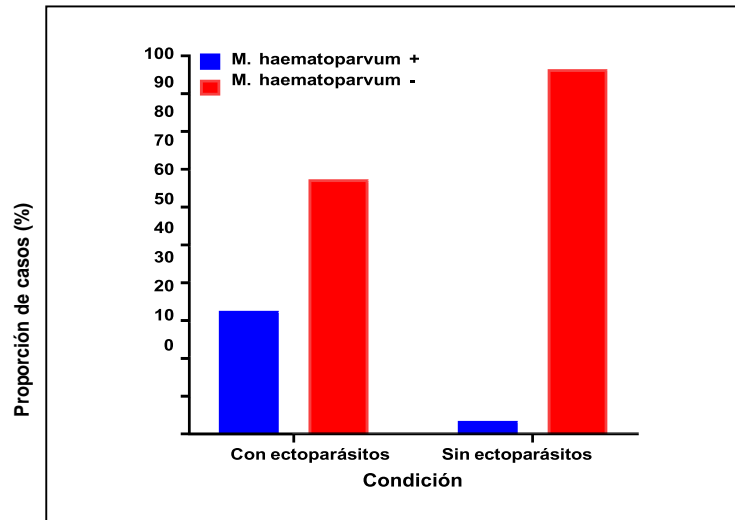


Gráfico 9

Asociación entre *Ca. M. haematoparvum* y presencia de ectoparásitos

4.6.3.4 Asociación entre *Ca. M. haematoparvum* y la presencia de lesiones en piel

De mismo modo de lo expuesto, se vinculó al *Ca. M. haematoparvum* con la presencia o no de lesiones de piel. Asociación entre la positividad o negatividad a *Ca. M. haematoparvum* y la presencia o ausencia de lesiones en piel (Test exacto de Fisher).

Tabla XXXVI: Asociación entre infección por *Ca. M. haematoparvum* y la presencia de lesiones en piel.

	Con lesiones en piel	Sin lesiones en piel	Total
<i>Ca. M. haematoparvum</i> +	8	8	16
<i>Ca. M. haematoparvum</i> -	28	56	84
Total	36	64	100

Prueba estadística: Test exacto de Fisher.

Hipótesis estadística: La distribución de casos positivos y negativos a *Ca. M. haematoparvum* es homogénea en sujetos con y sin lesiones en piel.

No se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p = 0,258$).

El 22,2% de los individuos con lesiones en piel (8/36) y el 12,5% de los individuos sin lesiones en piel (8/64) fueron *Ca. M. haematoparvum*+ frente al 77,8% de los individuos con lesiones en piel (28/36) y el 87,5% (56/64) de los individuos sin lesiones en piel que fueron *Ca. M. haematoparvum*. La diferencia es estadísticamente no significativa por lo que se concluye que la positividad o negatividad a *Ca. M. haematoparvum* es homogénea entre individuos con y sin lesiones en la piel.

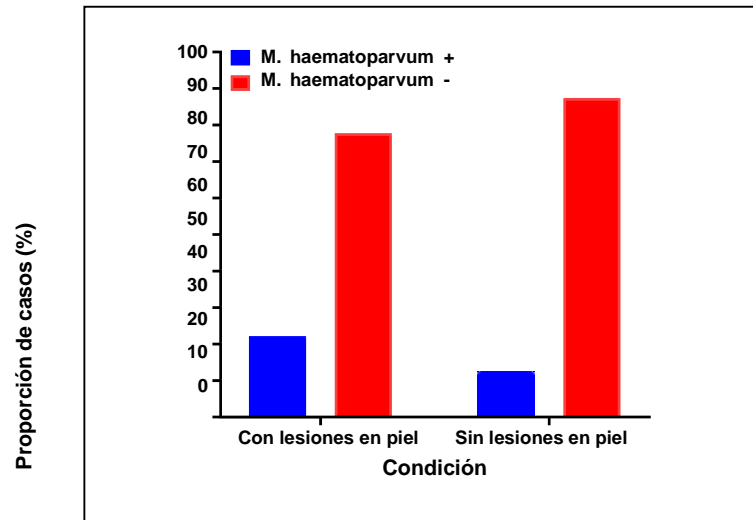


Gráfico 10

Asociación entre *Ca. M. haematoparvum* y lesiones en piel

4.6.3.5 Asociación entre especies de MH y alojamiento

Asociación entre la positividad a *Ca. M. haematoparvum* y *M. haemocanis* y alojamiento (Test exacto de Fisher).

Tabla XXXVII: Asociación entre infección por *Ca. M. haematoparvum* y *M. haemocanis* y alojamiento

	<i>M. haemocanis</i> +	<i>Ca.M. haematoparvum</i> +	Total
Criaderos	8	2	10
Domicilios	56	2	58
Refugios	20	12	32
Total	84	16	100

Prueba estadística: Chi-cuadrado

Hipótesis estadística: la distribución de casos positivos de *M. haemocanis* + y *Ca. M. haematoparvum* + es homogénea entre perros de diferentes alojamientos.

Se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p < 0,0001$).

Los casos positivos a *M. haemocanis* provinieron en un 23,8% (20/84) de refugios, un 9,5% (8/84) de criaderos y el 66,7% (56/84) restante de domicilios valores que difieren de los registrados como positivos a *Ca. M. haematoparvum* que fueron de 75,0% (12/16), 12,5% (2/16) y el 12,5% (2/16), respectivamente. La diferencia es estadísticamente significativa por lo que se concluye que la positividad a *M. haemocanis* y a *Ca. M. haematoparvum* no es homogénea entre individuos de diferente alojamiento, siendo el primero más frecuente en casos derivados de domicilios y el segundo más frecuente en aquellos provenientes de refugios.

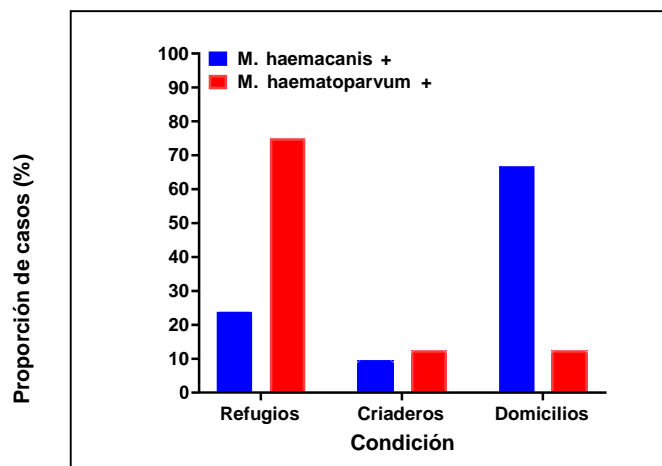


Gráfico 11

Asociación entre infección por *Ca. M. haematoparvum* y *M. haemocanis* y alojamiento

4.6.3.6 Asociación de la infección por especies de MH y edad

Una pregunta en la evolución de los resultados fue, que incidencia pueden tener las diferentes especies mayormente halladas con respecto a la edad. Asociación entre la positividad a *Ca. M. haematoparvum* y *M. haemocanis* y la categoría etaria (Test exacto de Fisher). (Se excluyeron las categorías etarias cachorros, gerontes y la especie *M. suis* por presentar muy baja frecuencia).

Tabla XXXVIII: Asociación de la infección por *Ca. M. haematoparvum* y *Mycoplasma haemocanis* y edad

	<i>M. haemocanis</i> +	<i>Ca.M. haematoparvum</i> +	Total
Jóvenes	12	7	19
Adultos	14	4	18
Total	26	11	37

Prueba estadística: Test exacto de Fisher

Hipótesis estadística: la distribución de casos positivos de *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum* es homogénea en sujetos jóvenes y adultos.

No se rechaza la hipótesis de homogeneidad ($p= 0,476$).

De los individuos jóvenes, el 63,2% (12/19) fue *M. haemocanis* positivos y el 36,8% (7/19) fueron *Ca. M. haematoparvum* positivos frente al 77,8% (14/18) y el 22,2% (4/18) de los individuos adultos respectivamente. La diferencia es estadísticamente no significativa por lo que se concluye que la positividad a ambos (*M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum*) es homogénea en individuos jóvenes y adultos.

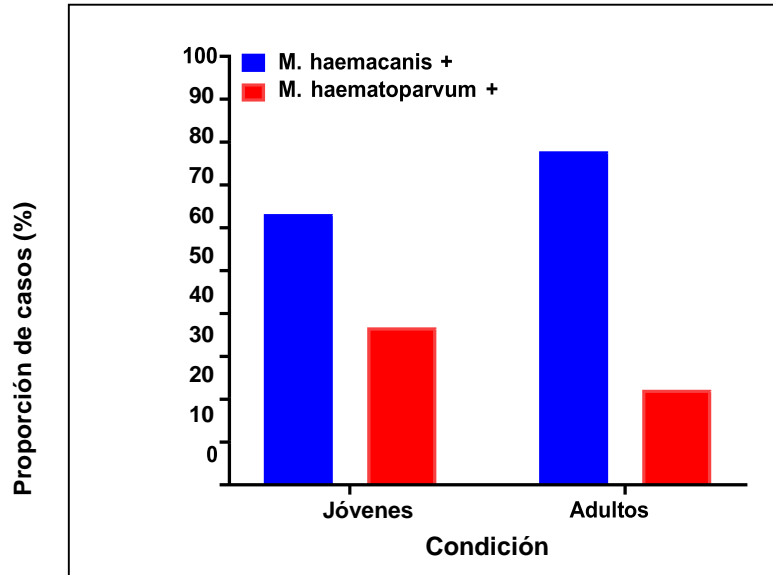


Gráfico 12
Asociación infección por *Ca. M. haematoparvum* y
M. haemocanis y edad.

5. Capítulo 5: DISCUSIÓN

5.1 Utilidad de las metodologías aplicadas para la detección de MH:métodos directos y métodos moleculares

La detección de MH se realizó en primera instancia a través de un método directo como es el microscopía, es decir la observación a 1000X de frotis sanguíneos coloreados, en búsqueda de ECMH, aunque con el conocimiento previo de que ésta es una técnica de baja sensibilidad y baja especificidad. Para confirmar la presencia de estos agentes se utilizó luego la PCR, técnica que se sabe posee tanto una sensibilidad como especificidad cercanas al 99%.

Puede considerarse a la PCR como prueba de elección para el diagnóstico de MH, ya que siendo estos microorganismos imposibles de aislar, no existe otro método más sensible y específico para su detección.

Cuando se analizó la concordancia entre pruebas, es decir se compararon los resultados de los métodos directos con los obtenidos por PCR, se pudo observar que la capacidad de la microscopía para detectar la infección por MH en perros infectados o positivos a PCR (positivos verdaderos) fue del 72%, mientras que los falsos positivos hallados fueron del 17%. De esta manera, la sensibilidad obtenida con esta prueba, fue superior a otros estudios en donde también se realizó el mismo tipo de comparación (Hampel J. A. et al., 2014), especialmente si se tiene en cuenta que los perros no presentaban sintomatología, y es conocido que la cantidad de MH en sangre es mayor cuando hay sintomatología clínica.

Se observó también que la capacidad de la microscopía para detectar la ausencia de infección en perros negativos a la PCR fue del 29%, lo que significa que en muchos casos se diagnosticaron como ECMH a corpúsculos de tamaño parecido a los cuerpos de Howell-Jolly, artefactos como precipitaciones de los colorantes, o especies bacterianas con similitudes morfológicas (Guimaraes A. M. S. et al., 2014; Maggi R. G. et al., 2013) dado el tamaño tan pequeño de estos agentes.

Como se mencionó, el valor 1,014 de la RS para la microscopía significa que un individuo con resultado positivo a la prueba tiene una probabilidad 1,014 veces mayor de tener efectivamente la condición investigada con respecto a un individuo con un resultado negativo. Esta RS fue muy baja, pero es un valor lógico teniendo en cuenta que se analizaron perros sin clínica, que aunque sean portadores de la infección, podrían no presentar un número de MH detectables en sangre (GroebelK.y col, 2014).

En cuanto a la técnica del frotis sanguíneo, resultó una técnica de fácil realización, bajo costo y suficientemente sensible para captar presencia de estos agentes infecciosos en poblaciones y ya se sabe es eficiente para diagnosticar animales con sintomatología clínica.

Resultó interesante verificar la similitud hallada entre los resultados de los extendidos de sangre de VMO y los de VCAB; esto da la posibilidad de procesar solamente la sangre obtenida de la VCAB, que se extrae rutinariamente para realizar estudios de química sanguínea y hemograma. La técnica de la punción de la VMO se ha popularizado en general para el estudio de los agentes hemopatógenos, pero no parece existir una ventaja en la detección de MH.

Como se dijo al principio de la discusión, la PCR posee elevadas sensibilidad/especificidad y es la única que permite la detección fehaciente de la infección. Complementada con la secuenciación, permite la detección de las especies de MH en una población. Contrariamente, la visualización de micoplasmas en sangre por microscopía puede ser inespecífica por la similitud con artefactos y poco sensible por la característica cíclica de la infección. La microscopía es una técnica limitada pero que se podría considerar para una búsqueda inicial o screening de estos agentes.

Una primera búsqueda por medio de frotis sanguíneos seguida de PCR y secuenciación se considera que podría constituirse en el algoritmo para la búsqueda de los MH en animales sin clínica.

5.2 Prevalencia de la infección por MH en perros determinada por PCR

La prevalencia de infección por MH en perros hallada mediante PCR fue del 48%.

Antecedentes actuales en Europa, como en el norte de Italia, de acuerdo con estudios realizados, la prevalencia general de la infección por MH en perros que deambulan libremente fue del 6,1%, siendo significativamente mayor que en los perros que no lo hacían ($P < 0.05$). Fueron identificados *M. haemocanis* en el 4,7% de los animales y *Ca. M. haematoparvum* en el 1,4% (Ravagnan S. et al., 2017). En ese estudio no se encontró asociación significativa entre la prevalencia de infección. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron una prevalencia más elevada en las poblaciones de perros estudiadas.

Un estudio en el sur de Brasil evaluó la prevalencia de hemoplasmas en la población humana de un asentamiento rural, en sus perros y caballos, todos altamente expuestos a las picaduras de garrapatas. Se analizaron muestras de sangre de 132 perros, 16 caballos y 100 humanos utilizando un ensayo de PCR en tiempo real SYBR Green seguido de una PCR en tiempo real TaqMan específica de especie. Cincuenta y nueve de 132 perros (44.7%) fueron positivos para hemoplasmas: 21 a *M. haemocanis* solo, 12 a *Ca. M. haematoparvum* solo y 21 a ambas especies. Solamente 1 de las 100 muestras humanas fue positiva mientras todas las muestras de caballos fueron negativas (da Costa Viera R y col, 2015). Si bien la infección por hemoplasmas en caninos fue altamente prevalente, la transmisión de estos agentes entre hospedadores no se observó y, por lo tanto, parece no ocurrir con frecuencia a pesar de la sobreexposición de agentes y vectores. En este caso además, las proporciones de presentación de especies de MH en perros fueron similares a las halladas en esta región de Argentina.

En Lima - Perú, se realizó un estudio en perros y gatos en el que se recolectaron 460 muestras de sangre (410 perros y 50 gatos) entre diciembre de 2017 y mayo de 2018. Los frotis se colorearon con Wright y las láminas de

reticulocitos con Azul Brillante de Cresilo. Hallaron *Cytauxzoon felis* en el 20% de los gatos, *Anaplasma* spp en el 0.2% de los perros y *Mycoplasma* spp en el 0.2% de los perros y en el 2% de los gatos (Raiden Grandía G, 2019). También en este caso se obtuvo una muy baja prevalencia comparada con nuestra realidad.

En cuanto a un estudio realizado en la provincia de Valdivia - Chile, sobre 278 muestras de sangre de perros, los resultados positivos a PCR para el conjunto de MH fue del 24.8%, mientras que las prevalencias fueron similares para las dos especies de MH, ya que se detectó el 11,2% de *M. Haemocanis* y el 12,2% de *Ca. M. haematoparvum* (Soto F., 2016). La prevalencia general fue menor que la obtenida en este trabajo de tesis, muy probablemente por las diferencias climáticas de esa región.

De acuerdo a los reportados sobre la prevalencia de la infección por MH, nuestros resultados fueron semejantes a los obtenidos en algunos países de Latinoamérica como Brasil, mientras que con respecto a otros como Perú y Chile y a aquellos obtenidos en Europa existe una gran diferencia, lo cual hace suponer que las variables como hábitos culturales, nivel educativo, clima, disponibilidad de información (entre otros) son las responsables de las diferencias en los resultados hallados. Se considera relevante que en futuros trabajos se incluya la variable cambio climático como disparadora del carácter endémico de la infección en los lugares de alta prevalencia.

5.3 Prevalencia de la infección por MH obtenida por PCR asociada a diferentes variables.

Los resultados de la PCR según la procedencia geográfica de las poblaciones estudiadas dentro de la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR no presentó diferencias comparada con la prevalencia en las muestras de procedencia rural (Isla Verde, Chañar Ladeado, Roldán, Carcarañá, Villa Mugueta, Fuentes y Totoras) con respecto a las de origen urbano (San Lorenzo, Villa Constitución, Rosario y Casilda), siendo el 67,74% en las áreas rurales versus el 63,42% en las urbanas. Las diferencias en el porcentaje de infección entre localidades se deben especialmente a las diferencias en el número de muestras recolectadas en cada una de ellas.

Los perros alojados en domicilios resultaron positivos en un 25%, un porcentaje menor (estadísticamente significativo) comparado con los criaderos en donde el 76% fue positivo y con los alojados en refugios en los cuales el 50% estaba infectado. Estos resultados pueden adjudicarse al hecho, que los propietarios realizan una tenencia responsable previniendo la infección a través de un control de vectores más eficiente, ya que se sabe que la transmisión de estos agentes se realiza a través de la picadura de artrópodos hematófagos como las pulgas y las garrapatas (Mesquita J. R. et al., 2021). La prevención de las ectoparasitosis y por lo tanto de la transmisión de MH con tratamientos adecuados instaurados tanto en los animales como en el medio ambiente, se cumple en general más en perros con tutor; la lucha contra estos vectores es más difícil cuando conviven numerosos individuos como sucede en los criaderos. Por otro lado, recientemente se lograron evidencias acerca de la posible transmisión vertical de *M. haemocanis* (Lashnits E et al., 2019), lo cual sería de vital importancia especialmente en el caso de los criaderos.

Teniendo en cuenta la variable sexo, quedó demostrado en este estudio que no influye en los porcentajes de infección: 45% de los machos estaban infectados versus el 50% de las hembras. Sin embargo, se debe considerar que la infección en hembras tendría una implicancia mayor por las recientes evidencias de transmisión vertical en perros, como se ha mencionado (Lashnits E et al., 2019). En cerdos y en otras especies de animales de producción, por las implicancias económicas que tendría la transmisión vertical, se buscaron durante mucho tiempo pruebas sobre este hecho, pero nunca se arribó a evidencias contundentes (Niethammer F. M. et al., 2018).

La diferencia en el porcentaje de infección entre los individuos de raza definida y mestizos (57.1% en las razas definidas vs el 46.3% en los mestizos) no es estadísticamente significativa; evidentemente, en ninguno de estos grupos existirían ni causas predisponentes ni resistencias particulares.

La presencia de lesiones cutáneas podría orientar al incremento del rascado como consecuencia de la infestación por ectoparásitos, y por ello vincularse con una mayor presencia de infección con MH, por mayor presencia de vectores hematófagos, puntualmente referidos a pulgas y garrapatas. Pero de acuerdo a los resultados documentados en los casos con y sin lesiones cutáneas no se manifestaron diferencias significativas (50.0% con lesiones vs 42.2% sin lesiones). Esta condición

hace suponer que un gran número de lesiones podrían provenir del rascado generado por procesos pruritogénicos de diferentes etiologías, como ser alergia ambiental (Olivry T.et al., 2015).

Se encontró que la presencia de ectoparásitos estuvo estadísticamente asociada a una mayor prevalencia de infección. De acuerdo a los resultados el 62.5% de perros con ectoparásitos fueron positivos en comparación con el 34.2% de perros infectados sin ectoparásitos. Siendo la micoplasmosis hemotrónica esencialmente una enfermedad vectorial, sería importante profundizar el conocimiento de los ciclos de vectores presentes en cada zona para profundizar en el estudio de las enfermedades producidas por MH.

De acuerdo a la variable edad: 74,4% en los jóvenes, 36,3% en los adultos y el 58% en los gerontes. Estos porcentajes no se correspondieron con las expectativas originales, ya que es de suponer que a mayor tiempo de exposición (gerontes) existiría una mayor posibilidad de contagio. No se encontró una explicación lógica para el alto porcentaje de positividad en jóvenes vs el obtenido en adultos y gerontes. Podría atribuirse este resultado la cantidad de muestras no fue equitativa entre las franjas etarias.

5.4 Detección de diferentes especies de MH detectadas por secuenciación y su asociación con diferentes variables

La micoplasmosis hemotrónica rara vez se ha informado en Latinoamérica. La enfermedad en perros es causada principalmente por *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum* (Gary A.T., 2006; Willi B., 2006). En general, se sabe poco sobre la ecología y quedan dudas sobre todas las posibles formas de transmisión de estas bacterias. Las muestras analizadas provinieron de perros asintomáticos, y en la enfermedad por MH los signos clínicos suelen ser variables (Chalker V.J., 2005; Messick J.B., 2003).

EL alto porcentaje de las muestras positivas a PCR, en las que se realizó secuenciación, la mayor prevalencia de *M. haemocanis* por sobre *Ca. M. haematoparvum* es coincidente con la hallada por otros autores (Compton S.M. et al, 2012).

Se detectó por primera vez la especie *M. suis* en perros, y este es un dato más que atenta contra la idea durante mucho tiempo sostenida acerca de la especificidad de especie de estos agentes y en particular el posible carácter zoonótico de los mismos (Welker Biondo A., 2009). Existen también reportes sobre el hallazgo de especies de MH de gatos (*Ca. M. turicensis*) en perros y zorros (Soto F. et al., 2016). *M. suis* se encontró en 8 perros, 6 de los cuales eran animales de zonas rurales (Roldán, Fuentes y Villa Mugueta), relacionadas con la producción porcina, lo que podría explicar este hallazgo, pensando en un probable contacto de cerdos y perros, o quizás entre vectores provenientes de los porcinos que pudieran infectar a los caninos. Esto plantea la necesidad de continuar relevando la presencia de especies de MH en las distintas especies animales.

M. suis es un patógeno porcino: puede causar anemias hemolíticas graves (anemia infecciosa de los cerdos, antes eperitrozoosis) de alta letalidad, aunque también se ha asociado con retraso del crecimiento e Infertilidad (Hoelzle L.E. et al. 2014). Esta detección de *M. suis* amerita

continuar con estudios que permitan aclarar el probable impacto de la infección por este agente en perros y revelar la posibilidad de que los porcinos o los caninos puedan actuar como reservorios en la transmisión de la infección.

Según la variable alojamiento, quedó en evidencia que los perros de criaderos estaban infectados mayoritariamente con un 47% con *Ca. M. haematoparvum* y en un 12% con *M. Suis*. Tanto en los domiciliados como los provenientes de refugios predominó con un 47% *M. haemocanis*, el 7% *Ca. M. haematoparvum* y el 26% *M. suis*. Particularmente en los refugios el 52% presentó *M. haemocanis*, el 21% *Ca. M. haematoparvum* y el 6% *M. suis*. Coincidentemente con otros trabajos, claramente se expresa el predominio del *M. haemocanis* excepto en los criaderos en los que se ha obtenido un resultado mayor para *Ca. M. haematoparvum*; no puede darse una explicación cierta a este hecho aunque podría pensarse que existirían diferencias en

la difusión de una determinada especie en una población, influida por ejemplo por distintas capacidades patogénicas de especie, u otras como la respuesta de los hospedadores, aunque no existe bibliografía al respecto (variables que no fueron estudiadas).

La variable sexo, no mostró diferencias. Lo mismo sucedió con la variable raza.

Se hallaron diferencias en el índice de infección producida por las distintas especies de acuerdo a la variable presencia/ausencia de lesiones cutáneas, ya que en aquellos perros con lesiones hubo un predominio de infección con *Ca. M. haematoparvum*. No se pudo comprobar la asociación entre perros PCR positivos y presencia de lesiones, si se vió que los perros con lesiones estaban infectados principalmente con *Ca. M. haematoparvum*. Este hecho tampoco posee una explicación a la luz de los conocimientos actuales sobre la biología/ecología de cada una de las especies de MH.

Al analizar los resultados de la PCR ya pudo corroborarse una asociación estadísticamente significativa con la presencia de ectoparásitos. Luego se evidenció que esa asociación se daba especialmente con la especie *Ca. M. haematoparvum*, lo cual podría hipotetizarse, pueda estar relacionado con el tipo de ectoparásito/vector presente, que en las poblaciones estudiadas fue predominantemente *C. felis*.

Se hallaron diferencias significativas de infección entre categorías etarias, los perros jóvenes fueron los más afectados.

5.5 Detección de otros agentes causantes de enfermedades vectoriales

Otros hemopatógenos fueron hallados de manera complementaria y enriquecedora en la búsqueda de MH. Se estudiaron 70 muestras y se hallaron los agentes *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli* y dos especies de *Bartonella*: *Bartonella clarridgeiae* y una no caracterizada o *Bartonella* spp, no detectándose *Ehrlichia* spp.

En Argentina los reportes sobre especies de *Anaplasma*, *Babesia* y *Ehrlichia* en perros son pocos y acotados a la Pcia de Buenos Aires. *Babesia canis vogeli* fue descrito en perros de la Ciudad de Buenos Aires. *Anaplasma platys* causante de anaplasmosis granulocítica y trombocitopénica y *Ehrlichia canis* de erlichiosis monocítica canina, sólo se detectaron en perros salvajes (Eiras D., 2018). Hasta ahora no existían reportes sobre agentes de enfermedades transmitidas por artrópodos en caninos domésticos de la región. La prevalencia de *Anaplasma platys* hallada en Córdoba y Santa Fe fue similar (15,7%) a la reportada en perros de Buenos Aires (Eiras D., 2018). En este trabajo de tesis se detectó una prevalencia alta de *Babesia canis vogeli* en Córdoba y Santa Fe (7%) (Mascarelli P., 2016) si se compara con un reporte previo de Buenos Aires del 0,77% (Eiras D., 2018). La detección de *Bartonella* no había sido realizada antes en perros; se reporta por primera vez la presencia de *Bartonella clarridgeiae* en perros. Las detecciones sólo pudieron hacerse por métodos moleculares y no a través de extendidos, ya que este estudio se realizó luego de extraído el ADN.

Esta búsqueda de hemopatógenos permitió detectar infecciones no reportadas previamente en perros de Argentina como ya se mencionó. La especie más conocida de *Bartonella* es *B. henselae* que produce en perros infecciones endoteliales con manifestaciones variables entre individuos, aunque en general consisten en alteraciones hepáticas, esplénicas y cutáneas. Es esperable que *B. clarridgeiae* produzca patologías similares, aunque en este trabajo los perros estaban sanos y eran solo portadores de los agentes hallados. La otra especie hallada y no caracterizada totalmente está relacionado estrechamente a *B. tribocorum* reportada en ratas.

Por último, cabe destacar el trabajo de Maggi R. y Krämer F. del 2019 sobre las enfermedades transmitidas por vectores en animales de compañía (ETPVAC), enfatizando que son una amenaza importante en la vida de las mascotas, pero también pueden tener un impacto en la salud humana, debido a su carácter a menudo zoonótico. La importancia y la conciencia de las ETPVAC aumentaron continuamente durante los últimos años, sin embargo la información sobre su ocurrencia sigue siendo limitada en varias partes del mundo. América Latina (LATAM), una región con gran biodiversidad, es una de estas regiones, donde la información sobre ETPVAC para dueños de mascotas, veterinarios, médicos y trabajadores de la salud a menudo es obsoleta, limitada o inexistente. Una búsqueda exhaustiva de literatura para ETPVAC

en animales de compañía (perros y gatos) se realizó para varios países de América Central (Belice, Islas del Caribe, Costa Rica, Cuba, República Dominicana República, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico), así como en América del Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana (Guyana Británica), Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay, Venezuela) con respecto a la aparición de las siguientes enfermedades parasitarias y bacterianas: babesiosis, gusano del corazón, dirofilariosis subcutánea, hepatozoonosis, leishmaniosis, tripanosomosis, anaplasmosis, bartonelosis, borreliosis, ehrlichiosis, micoplasmosis y rickettsiosis. No solo ninguno de estos países resultó completamente libre de ETPVAC sino que la revisión confirma una amplia distribución. Esta gran ocurrencia y el hecho de que la mayoría de los ETPVAC pueden tener un resultado clínico bastante severo y sus opciones de diagnóstico y terapéuticas en la región a menudo son de difícil acceso, exige un fuerte llamado para la prevención de la transmisión de patógenos mediante el uso de productos ectoparasiticidas y una mejora en la alimentación, así como mediante la realización de cambios de comportamiento.

Cabe destacar, que también se detectaron coinfecciones con dos o más patógenos identificados: *M. haemocanis* y *Ca. M. haematoparvum* (5,7%); *M. haemocanis* y *A. platys* (7,1%); *M. haematoparvum* y *A. platys* (8,6 %); y *M. haemocanis* y *B. vogeli*. Todos los los perros infectados *A. platys* también estaban infectados con *Mycoplasma* spp. (ya sea *M. haemocanis* o *Ca. M. haematoparvum*). Si bien, estas combinaciones, se presentaron en bajos porcentajes, plantean un nuevo desafío para continuar profundizando acerca de los factores predisponentes de estas comorbilidades y sus implicancias en la salud de sus hospedadores.

5.6 Relevamiento de ectoparásitos en la región estudiada y detección de MH en pulgas y garrapatas.

Las pulgas recuperadas de los perros estudiados se correspondieron con las 2 especies más frecuentes en perros: *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis*. La diferencia de convexidad en el borde del perfil de la cabeza de estas especies es una característica simple de identificar en consultorio con la asistencia de un mínimo aumento, diferenciarlas es importante ya que la pulga de gato es más reactiva para

los perros.

Las garrapatas recuperadas se correspondieron exclusivamente con *Rhipicephalus sanguineus*.

El 43% de los perros estudiados presentaban ectoparásitos, en su mayoría pulgas, y especialmente *C. felis* (el 40%, casi la mitad). *C. canis* solo constituyó el 18% del total de parasitados. Mientras tanto solo el 9% estaba parasitado con garrapatas, específicamente *R. sanguineus*. El predominio de *C. felis* es coincidente con la distribución mundial documentada (Lawrence A. ycol, 2015; Taenzler J., 2014; Wall R., 2010).

Se registró la particularidad del elevado número de *C. canis* en la población de perros de refugio de Isla Verde. Si bien la presencia de *C. felis* se dio en el 88% de los perros parasitados, el hallazgo del 73% de *C. canis* no se observó en otras poblaciones.

La recuperación de solo el 9% de garrapatas, no correlacioné según lo esperado debido al deficiente estado sanitario de algunos de los alojamientos muestreados en donde había una elevada infestación por pulgas. Podría haber sucedido que ciertos factores climáticos no hayan favorecido la aparición de garrapatas durante la etapa de toma de muestras.

Este relevamiento de estas especies de ectoparásitos en perros de la región no había sido realizado con anterioridad.

Los resultados positivos obtenidos por PCR en los pooles de pulgas y garrapatas ratificaron la presencia de MH en estos ectoparásitos, hecho que los implica en el posible rol de vectores. No se pudieron demostrar diferencias en su participación: se obtuvieron pooles separados de *C. felis* y *C. canis* pero no quedó claro si existían vínculos diferentes entre la infección con MH y el tipo de vector hematófago. Siendo la picadura de ectoparásitos la principal forma de transmisión de MH en perros, ameritaría continuar con nuevos estudios y determinar si existe una predominancia en el contagio de especies de MH de acuerdo al vector.

6. Capítulo 6: CONCLUSIONES

- Se detectó por primera vez la presencia de micoplasmas hemotróficos utilizando la técnica de PCR en perros de la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario.
- Se confirmó la presencia de las especies *M. haemocanis*, *Ca. M. haematoparvum* y *M. suis* en perros de la región estudiada.
- Se describió por primera vez la presencia de la *M. suis* en perros.
- Se detectó un elevado porcentaje de perros infectados con MH utilizando la técnica de PCR en las poblaciones estudiadas.
- El porcentaje de perros infectados con MH detectados por PCR fue menor en los animales alojados en domicilios.
- El porcentaje de perros infectados con MH detectados por PCR fue mayor en los jóvenes.
- El porcentaje de perros infectados con MH utilizando la técnica de PCR fue mayor en aquellos parasitados con pulgas y garrapatas; comprobándose que el ectoparásito más frecuente en los perros de la región estudiada fue la pulga *C. felis*.
- No existieron diferencias significativas entre los porcentajes de infección detectados por PCR en perros de diferentes sexo y raza, ni en aquellos con lesiones cutáneas compatibles con rascado.
- El porcentaje de perros infectados con *M. haemocanis* fue mayor en aquellos alojados en domicilios mientras que el porcentaje de perros infectados con *Ca. M. haematoparvum* fue mayor en los alojados en refugios.
- En los perros con pulicosis fue más frecuente la infección con *Ca. M. haematoparvum* que con *M. haemocanis*.

- Aunque *Mycoplasma* spp. fue el patógenoproducción de ETPV más frecuentemente hallado, también se detectaron los patógenos *Anaplasma platys*, *Bartonella clarridgeiae* y *Babesia canis vogeli*.
- Fueron identificadas coinfecciones con dos o más patógenos causantes de ETPV en las cuales se encontraban *M. haemocanis* y *Ca.M. haematoparvum*.
- No existieron diferencias significativas entre la detección de ECMH en frotis provenientes de sangre de VMO y de VCAB.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Boga, B., Codina Grau, M.G., Matas Andreu, L. y Meseguer Peinado, M.A. (2011). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Mycoplasma spp y Ureaplasma spp. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
- Arias-Stella, J., Lieberman, P., Erlandson, R. y Arias-Stella, J. Jr. (1986). Histology, immunohisto chemistry and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *American Journal Surg Pathol.* 10:595-610.
- Armstrong, D., Yu, A., Yagoda and Kagnoff, M.F. (1971). Colonization of humans by *Mycoplasma canis*. *J. Infect. Dis.* 124: 607-609.
- Balish, M. F. & Krause, D. (2006). *Mycoplasmas: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria.* *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11:244-255.
- Barile, M.F., Del Giudice, R.A., Carski, T.R., Yamashiroya, H.M. y Verna, J.A. (1970). Isolation and rapid identification of Mycoplasma species from canine tissues by plate immunofluorescence. *Proc Soc Exp Biol Med.* 970;134: 146-148.
- Barker, E.N., Tasker, S., Day, M.J., Warman, S.M., Woolley, K, Birtles, R., Georges, K.C., Ezeokoli, C.D., Newaj-Fyzul, A., Campbell, M.D., Sparagano, O.A., Cleaveland, S. y Helps, C.R. (2010). *Development and use of real-time PCR to detect and quantify Mycoplasma haemocanis and "Candidatus Mycoplasma haematoparvum" in dogs.* *Veterinary Microbiology.* 140, 167-170.
- Baseman, J.B. y Tully, J.G. (1997). *Mycoplasmas: sophisticated, reemerging and burdened by the irrotoriety.* *Emerg Infect Dis,* 3,21-32.
- Bellamy, J.E, Macwilliams, P.S., Searcy G.P. (1978). *Cold-agglutinin hemolytic anaemia and Haemobartonella canis infection in a dog.* *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173:397- 401
- Benjamin, M., Lumb, W.V. (1959). *Haemobartonella canis infection in a dog.* *J Am Vet*

Med Assoc, 135:388-90.

- Berent, L.M., Messick, J.B. y Cooper, S.K. (1998). Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*, 59 (10):1215-1220. PMID: 9781450.
- Bergmann, N., Hartmann, K. (2017). Vector-borne diseases in cats in Germany, 45 (K): 329-335. <http://dx.doi.org/10.15654/TPK-160874>
- Biberstein, E.L. y Hirsh, D.C. (2002). The urinary tract as a microbial habitat; urinary tract infections. In: Hirsh, D.C., and Y.C. Zee (eds), *Veterinary Microbiology*, pp. 178-184.
- Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B., Alleman, A.R. and Pitulle, C. (2002). Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. *AJVR*, Vol 63, No. 10, October 2002.
- Bravo-Grau, S., Cruz Q, J. P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista Chilena de Radiología*. 21(4), 158-164.
- Bundza, A., Llumsden, J.H., McSherry, B.J, Valli, V.E. y Jazen, E.A. (1976). *Haemobartonellosis in a dog in association with Coombs*" positive anemia. *Can Vet Journal*, 17:267-70.
- Carson, J.L., Hu, P.C. y Collier, A.M. (1992). *Cell structure and functional elements*. In *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (edited by Maniloff, McElhaney, Finch and Baseman). American Society for Microbiology, pp. 63-72.
- Chalker, V.J. (2005). *Canine mycoplasmas*. *Res Vet Sci*, 79,1-8.
- Chan, C.M., Ridgway, M.D., Mitchell, M.A. y Maddox, C.W. (2013). Association between *Mycoplasma*-specific polymerase chain reaction assay results and oral bacterial contamination of bronchoalveolar lavage fluid samples from dogs with

respiratory tract disease: 121 cases (2005- 2012). *J Am Vet Med Assoc.*, 243:1573-1579.

Chandler, J.C., Lappin, M.R. (2002). Mycoplasmal respiratory infections in small animals: 17 cases (1988-1999). *J Am Anim Hosp Assoc.*, 38:111-119.

Compton, S., Maggi, R.G. y Breitschwerdt, E.B. (2012). Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Com. Immunol Microb & Infectious Diseases*, 35,557-562.

Compton, S.M., Maggi, R.G. and Breitschwerdt, E.B. (2012).

Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(6), 557-562.

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A. y Barba-Carretero, J.C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Vet. Microbiol.* 93, 307-317.

da Costa Vieira, R. F., Vidotto, O., Wischral, T. S., Vieira, J., Márcia Sá Guimaraes, A., Pires dos Santos, A., Nascimento, N.C., Rodrigues dos Santos, N. J., Martins, T. F., Labruna, M. B., Marcondes, M., Biondo, A.

W. y Belle, J. (2015). Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in human beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 57(4),353-357.

Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol*, 152(3-4):173-85. 130.

de Moraes, H.S.A., Dagnone, A.S., Trapp, S.M., Vidotto, O. & Messick, J.B. (2003). *Mycoplasma haemocanis* (previously, *Haemobartonella canis*) infection in non-splenectomized dogs in Brasil: 4 cases (1999- 2001). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2003; 17, 42.

- Dean, R., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Tasker, S. (2005). *Use of real-time PCR to detect M. haemofelis and Candidatus Mycoplasma haemominutum in the saliva and salivary glands of haemoplasma- infected cats*. In: Proceedings of the BSAVA Congress, Gloucester, UK, p. 554.
- Dianxiang, Y., Xiuzheng, T., Ying, Q. y Sheng, Y. (2000).
Prevalence of Eperythrozoon spp. Infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia. *China.Epidemiol. Infect.* 125, 421-426.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.022>
- Dietz, S. Mack, S., Hoelzle, K., Becker, K., Jannasch, C., Stadler, J., Ritzmann, M. y Hoelzle, L.E. (2014). Quantitative PCR analysis of Mycoplasma suis shedding patterns during experimental infection. *Veterinary Microbiology* 172, 581–585.
- Donovan, E.F. and Loeb, W.F. (1960). Hemobartonellosis in the dog. *VetMed*. p 55:57-62.
- Dosa, E., Nagy, E., Falk, W., Szoke, I. y Ballies, U. (1999). Evaluation of the Etest for susceptibility testing of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *J Antimicrob Chemother* 43:575-578.
- Dos Santos, A.P., Dos Santos, R.P., Biondo, A.W, Dora, J.M, Goldani, L.Z, De Oliveira, S.T, DeSa Guimaraes, A.M, Timenetsky, J., De Moraes, H.A, Gonzalez, F.H y Messick, J.B. (2008). Infección por hemoplasma en paciente VIH positivo, Brasil. *Emerg Infect Dis*, 14:1922-1924.
- Eaton M. D., Meiklejohn G. y Van Herick W. (1944). Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: I. A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *J Exp Med*, 79:649-668.
- Eberle, G. y Kirchhoff, H. (1976). Studies on the incidence of Mycoplasma in newborn and through cesarean-section-delivered dogs. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 5, 495-497.
- Edward, D.G. & Fitzgerald, W.A. (1951). The isolation of organisms of the pleuropneumonia group from dogs. *J Gen Microbiol*, 5:566-575.

- Ericsson, A.C., Personett, A., Grobman, M.E., Rindt, H. y Reiner, C.R. (2016). Composition and predicted metabolic capacity of upper and lower airway microbiota of healthy dogs in relation to the fecal microbiota. *PLoS One*. 2016;11: e0154646.
- Felder, K., Carranza, P., Gehrig, P., Roschitzki, B., Barkow-Oesterreicher, S., Hoelzle, K., Riedel, K., Kube, M. y Hoelzle, L. (2012). Insights into the Gene Expression Profile of Uncultivable Hemotrophic *Mycoplasma suis* during Acute Infection, Obtained Using Proteome Analysis. *Journal of Bacteriology*, 194(6), 1505-1514.
- Felder, K.M, Hoelzle, K., Heinritzi, K., Ritzmann, M. y Hoelzle, L.E. (2010). Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia. *BMC Vet Res* 6, 18.
- Felder, K.M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K. y Hoelzle, L. (2011). Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 27:557-564.
- Foley, J.E. y Pedersen, N C. (2001). *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, a low-virulence erythrocytic parasite of cats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 815-817
- Foley, J.E., Brown, R.N, Gabriel, M.W, Henn, J., Drazenovich, N, y Kasten, R.(2007). et al. Spatial analysis of the exposure of dogs in rural north-coastal California to vectorborne pathogens. *Vet Rec*. 161(19):653-7.
- Frederic Almy, S., Ladd, S., Phillip Sponenberg, D., Crisman, M. y Messick, J.(2006). *Can Vet J*, 47:229-233. Vol. 47.
- García, L.P. y Rodríguez López, J. C. (2018). *Mycoplasma haemocanis*: reporte de un caso en el País Vasco. <https://www.portalveterinaria.com/animales-de-compania/articulos/28190/mycoplasma-haemocanis-reporte-de-un-caso-en-el-pais-vasco.html>
- Gómez, N., y Guida, N. (2010). *Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos*. Inter-Médica.
- Grandía, R., Fuentes, R., Pérez, J., Hernández, J., Castillo, M., Anicama, W.,

- Caballero, J., Rojas, L., Galindo, I., Díaz, L. y Fimia-Duarte, R. (2019). Hematological findings in dogs and cats in Lima, Peru. *Revista de Investigaciones Vet del Perú*, 30(4), 1395-1413.
<https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17154>
- Grenne, C.E. (2008). *Enfermedades Infecciosas del Perro y el Gato*. (3^o ed.). Inter-Médica.
- Greene, C.E. y Chalker, V.J. (2002). Non hemotropic mycoplasmal, ureaplasma, and L-form infections. In: Greene, C.E. (ed.) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4^o ed.). (pp 319-324). Elsevier Health Sciences.
- Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M., Ziegler, U. y Hoelzle, L.E. (2009). Mycoplasma suis invade eritrocitos porcinos. *Infectar inmunidad*.77:576-584.
- Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M. M., Ziegler, U. y Hoelzle L. E. (2009). Mycoplasma suis Invades Porcine Erythrocytes. *Infection And linmunity*, 77(2), 576-584
- Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L. y Huxsoll, D.L. (1975). Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). *Am J Vet Res*. 36(7):937-40.
- Gunn, K., Nicha, L., Sarawut, Y., Sarawan, K., Naris, T., Theerapol, S., Sathaporn, J. y Stanley G.F. Association of Ehrlichia canis, Hemotropic Mycoplasma spp. and Anaplasma platys and severe anemia in dogs in Thailand. *Veterinary Microbiology*, 201, 195-200.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.022>
- Hampel, J.A., Spath, S.N., Bergin, I.L., Lim, A., Bolin, S.R. y Dyson, M.C. (2014). Original Research Prevalence and Diagnosis of Hemotropic Mycoplasma Infection in Research Sheep and Its Effects on Hematology Variables and Erythrocyte Membrane Fragility. *Comparative Medicine. American Association for Laboratory Animal Science*, 64(6), 478-485.

- Happia, A., Toepfb, A., Ugwua, C.A., Petersenb, C. y Sykesc, J. (2017). Detection and identification of blood-borne infections in dogs in Nigeria using light microscopy and the polymerase chain reaction. *Vet ParasitolReg Stud Reports*, 11, 55-60. doi:10.1016/j.vprsr.2017.12.002.
- Hoelzle, K., Simone, P., Sidler, M., Kramer, M., Wittenbrink, M., Felder, M. and Hoelzle, L. (2010). Inorganic pyrophosphatase in uncultivable hemotrophic mycoplasmas: identification and properties of the enzyme from *Mycoplasma*. *Microbiology*, 10, 194.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M., Ute., Dreher, M., Gönczi, E., Deplazes P., Braun, U., Engels, M., Schüpbach, J., Jörger, R., Thoma, R., Griot, C., Stärk, K. D., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K. M. y Lutz, H. (2004). Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. *American Society for Microbiology Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3775-3780. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3775-3780.2004>.
- Hornok, S., Hofmann-Lehmann, R., Fernández de Merac, M.L., Melib, V. Elekd, I., Hajtósd, A., Répásid, E., Gönczib, B., Tánczosa, R., Farkasa, H., Lutzb, J. y de la Fuente, E. (2010). Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia*. *Veterinary Parasitology*, 174(3-4), 355-358.
- Hoskins, J.D. (1991). Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. *Can. Pract*, 16: 13-21.
- Howard, C., y Gourlay, R. (1978). Mycoplasmas of animals. *Sci Prog*, 65(259), 313-329.
- Hulme-Moir, K.L, Barker, E.N, Stonelake, A., Helps, C.R y Tasker, S. (2010). Use of real-time polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:582-587.
- Inokuma, H., Oyamada, N., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B. Hammad,

- A., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., y Brouqui, P. (2006) Epidemiological Survey of Ehrlichia canis and Related Species Infection in Dogs in Eastern Sudan. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1078: 461- 463.
- Ishak, A., Radecki, S. y Lappin, M. (2007). Prevalence of Mycoplasma haemofelis, „Candidatus Mycoplasma haemominutum“, Bartonella species, Erlichia species and Anaplasma phagocytophy-lum DNA in the blood of cats with anemia. *J Feline Med Surg*, 9,1-7.
- Jambhekar A., Robin E. y Le Boedec K. A (2018). systematic review and meta-analyses of the association between 4 mycoplasma species and lower respiratory tract disease in dogs. DOI: 10.1111/jvim.15568. wiley on line library.com/journal/jvim J Vet Intern Med. 2019; 33:1880-1891.
- Jang, S. S., G. V. Ling, R. Yamamoto y Wolf, A. M. (1984). Mycoplasma asa cause of canine urinary tract infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 185, 45-47.
- Kemming, G., Messick, J. B., Muellere, W., Enders, G., Meisner, F., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Schropp, A., Wojtczykam C., Packert, K., Messmer, K. y Theina, E. (2004). Can We Continue Research in Splenectomized Dogs? Mycoplasma haemocanis: Old Problem. *New Insight. Eur Surg Res*, 36:198-205.
- Kemming, G., Messick, J. B., Enders, G., Boros, M., Lorenz, B., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Mueller, W., Hahmann-Mueller, A., Messmer, K. y Thein, E. (2004). Mycoplasma haemocanis Infection—A Kennel Disease?. *Comparative Medicine*, 54(4), 404-409.
- Kenny, M., Shaw, S., Beugnet, F. y Tasker, S. (2004). Demonstration of Two Distinct Hemotropic Mycoplasmas in French Dogs Mycoplasma as a cause of canine urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 5397-5399.
- Koshimizu, K., y Ogata, M. (1974). Characterization and differentiation of mycoplasmas of canine origin. *Jpn. J. Vet. Sci.* 36, 391-406.
- L'Abbe'e-Lund, T. M., R. Heiene, N. F. Friis, P. Ahrens, and H. Sørum, (2003).

Mycoplasma canis and urogenital disease in dogs in Norway. *Vet. Rec.* 153, 231-235.

Lappin, M., Griffin, B., Brunt, J., Riley, A., Burney, D., Hawley, J., Brewer, M. y Jensen, W. (2006). Prevalence of Bartonella species, hemoplasmas species Erlichia species, Anaplasma phagocytophilum and Neorickettsia risticii DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg*, 8, 85-90.

Lashnits, E., Grant, S., Thomas, B., Qurollo, B. y Breitschwerdt, E. (2019). Evidence for vertical transmission of Mycoplasma haemocanis, but not Ehrlichia ewingii in a dog. *Vet Intern Med.*, 33, 1747-1752.
wileyonlinelibrary.com/journal/jvim

Lawrence, A.L., Sze-Fui Hii, Jirsová, D., Panáková, L., Ionica, A. M., Gilchrist K., Modrý, D., Mihalca, A.D., Webb, C. M., Traub, R.J. y Slapeta, J. (2015). Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (Ctenocephalides felis) and dog fleas (Ctenocephalides canis) vectoring Rickettsia felis in central Europe. *Vet. Parasitol.*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.029>.

Lluch Senar, M. (2010). *Estudio de la Expresión Génica y la División Celular en Mycoplasma genitalium*. Universitat Autònoma de Barcelona. [Tesis de Doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona]. TDX.
<https://www.tdx.cat/handle/10803/3635;jsessionid=7DA0B635DCEE442B37248390166232A9#page=1>

Ludwig, E., Hoelzle, M., Felder, K. M. y Hoelzle, K. (2014). Review. *Pathobiology of Mycoplasma suis*. *Veterinary Journal*, 202(1), 20-25.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.023>

Lumb, W. (1961). *Canine Haemobartonellosis and Its Feline Counter part* Calif Vet, 14, 24-25.

Macieira, D. B., de Menezes, R. de C., Damico, C. B., Almosny, N. R., Mc Lane, H. L., Daggy, J. K. y Messick, J. B. (2008). Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency

virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro-Brazil. *J Feline Med Surg*, 10, 120-129.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. (2009). *Biología de los microorganismos* (12ªed.). Pearson Educación.

Maggi, R., Compton, S., Chelsea, L., Trull, Mascarelli, P., Mozayeni, R., y Breitschwerdt, R. (2013). Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3237- 3241.

Maggi, R. G. & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites Vectors*, 12, 145. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>

Maggi, R. G., Compton, S. M., Trull, C. L., Mascarelli, P. E., Mozayeni, B. R. y Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection with hemotropic Mycoplasma sp. In people with and without extensive arthropod and animal contact. *Journal Clin. Microbiol*, 51, 3237-3241.

Maggi, R.G., Chitwood, M.C., Kennedy-Stoskopf, S. y De Perno, C.S. (2013). Novel Hemotropic Mycoplasma species in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Comparative Immunology, Microbiology y Infectious Diseases*, 36, 607-611.

Maggi, R.G., Compton, S.M., Trull, C.L., Mascarelli, P.E., Mozayeni, B.R. y Breitschwerdt, E.B. (2013). Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3237-3241. <https://doi.org/10.1128/JCM.01125-13>.

Mendez Arriola, J.E. e Hidalgo Armijos, M.P. (2013). Determinación de Hemobartonelosis felina en parroquias urbanas de la ciudad de Cuenca. [Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias Veterinarias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4661>

Meseguer-Peinado, M.A., Acosta-Boga, B., Matas-Andreu, L. y Codina- Graud G. (2012). Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol*

Clin, 30(8):500-504.

Mesquita, J. R., Oliveira, A. C., Neves, F., Mendoza, J. R., Luz, M. F., Crespol., dos Santos, T. F., Santos-Silva, S., Vilhena, H. y Barradas, P. F. (2021). Hemotropic Mycoplasma and Bartonella Species Diversity in Free-Roaming Canine and Feline from Luanda, Angola. *Pathogens*, 10, 735. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060735> Academic

Messick, J., Walker, P. G., Raphael, W., Berent, L. M y Shi, X. (2002).

„Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis” sp. nov., „Candidatus Mycoplasma haemolamae” sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog *Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52, 693- 698.

Messick, J. (2003). New perspectives about hemotropic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim*, 33, 1453-1465.

Messick, J. (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1).

Messick, J., Walker, P., Raphael, W., Berent, L. y Xun Shi. (2002).

„Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis” sp. nov., „Candidatus Mycoplasma haemolamae” sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 693-698. DOI: 10.1099/ijs.0.01861-0

Messick, J., Cooper, S. y Huntley, M. (1999). Desarrollo y evaluación de un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa utilizando el gen 16S rRNA para la detección de *Eperythrozoon* y su infección. *J Vet Diagn Invest*, 11: 229-236.

Messick, J.B. (2003). *New perspectives about hemotropic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats.* *Vet*

Clin North Am SmallAnimPract,33,1453-65.

Messick, J. (2003). New perspectives about hemotropic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33,1453-1465.

Messick, J. (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) review and new insights into pathogenic potential. *VetClin Pathol*, 33,2-13.

Michael, T.M., Martin J., Dunlap P., Colark, D. y Brock. (2009). *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.

Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V. y Hamon, M. (2011). Novel Hemotropic Mycoplasma (Hemoplasma) in a Patient with Hemolytic Anemia and Pyrexia. *Clinical Infectious Diseases*, 53(11):147-1.

Morris, S. (2020). *Infecciones en mucosas por clamidias, micoplasmas y ureaplasmas*. University of California San Diego. <https://www.msdmanuals.com/es-ar/professional/enfermedades-infecciosas/enfermedades-de-transmisi%C3%B3n-sexual/infecciones-en-mucosas-por-clamidias-micoplasmas-y-ureaplasmasdic.2020>

Neimark, H., Johansson, K., Rikihisa, Y. and Tully, J. (2001). Proposal to transfer some members of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with descriptions of „Candidatus Mycoplasma haemofelis“, „Candidatus Mycoplasma haemomuris“, „Candidatus Mycoplasma haemosuis“ and „Candidatus Mycoplasma wenyonii“. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51:891- 899.

Neimark, H., Hoff, B. and Ganterm, M. (2004). Mycoplasma ovis comb. nov. (formerly Eperythrozoon ovis), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 365-371.

Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y. Tully, J. (2002). Revision of hemotropic Mycoplasma species names. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52,683.

Niethammer, F. M., Ade, J., Hoelzle, L. E. y Schade, B. (2018). Hemotropic mycoplasma in Simmental cattle in Bavaria: prevalence, blood

parameters, and transplacental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemobos* and *Mycoplasma wenyonii*. *Acta Vet Scand*, 60:74. DOI:10.1186/s13028-018-0428-y

Novacco, M., Meli, M. L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M.G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapic, T., Willi, B., Wolfa G., Lutz, H. y Hofmann-Lehmann, R. (2010)., Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, 42. 276-284.

Ogata, M., (1983). Recovery and identification of canine and feline mycoplasmas. In: Tully, J. G., y S. Razin (eds), *Methods in Mycoplasmaology Vol II Diagnostic Mycoplasmaology*, 105-113.

Oliveira Conrado, F., Cannes do Nascimento, N., Pires Dos Santos, A. Kraemer Zimpel, C., Messick, J. y Welker Biondo, A. (2015). Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos. *BMC veterinary research*, 11, 286. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0601-8>

Olivry, T., De Boer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., Nuttall T. y Prélud, P. (2015). For the International Committee on Allergic Diseases of Animals. Tratamiento de la Dermatitis Atópica Canina: Lineamientos actualizados 2015 del Comité Internacional de Enfermedades Alérgicas en Animales (ICADA). *BMC Veterinary Research*, 11, 210.

Ortiz Ibarra, F. J. (2009). Importancia diagnóstica de los micoplasmas y su participación en la salud reproductiva y perinatal. *Enf Inf Microbiol*, 29(2).

Papazahariadou, M. G., Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A. F., Papadopoulos, E.G., y Leontides, L. (2003) Tick infestation of dogs in Thessaloniki, northern Greece. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 110-113.

Pereyra, N. (2009). *Aspectos clínicos, epidemiológicos y terapéuticos de la hemoplasmosis (epiritrozoosis) porcina*. [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires].

Pereyre, S., Gonzalez, P., de Barbeyrac, B., Darnige, A., Renaudin,

H., Charron, A., Raheriso, S. & Bébéar, C. (2002) M. Mutations in 23S

rRNA Account for Intrinsic Resistance to Macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for Acquired Resistance to Macrolides in *M. hominis*. *ASM Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10).

DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3142-3150.2002>

Pollack, J., Williams, M. y Mc Elhaney, R. (1997). The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells.

Crit Rev Microbiol, 23, 269-354.

Puntaric, V., Borcic, D., Vukelic, D., Jeren, T., Brek, V., Wikerhauser, T. y Richter, B. (1990). Eperythrozoonosis - a new disease in human pathology. *Giorn Malat Inf Parassit*, 42, 539-540.

Randolph, J.F., Moise, N., Scarlett, J.M, Shin, S.J, Blue, J.T. y Bookbinder. P. (1993). Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *Am J Vet Res*, 54:387-391.

Ravagnan, S., Carli, E., Piseddu, E., Da old, G., Porcellato, E., Zanardello, C., Carminato, A., Vascellari, M. y Capelliet, G. (2017). Prevalence and molecular characterization of canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy. *Parasites & Vectors*, 10, 132. DOI 10.1186/s13071-017-2069-9.

Razin, S. (1994). DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. *Molecular and Cellular Probes*, 8, 49-51.

Rikihisu, Y. et al. (1997), Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J. Clin. Microbiol*, 35:823- 829.

- Ristic, M, y Kreier, J.P. (1984). Family. III. Anaplasmataceae Philip 1957, 980AL. In: Krieg NR and Holt JG (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (pp. 719-729). *Williams & Wilkins*.
- Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M. D., Barker, E. N., Planellas, M., Helps, C. R., Francino, O., Shaw, S. E., Tasker, S., y Kreier, J.P. (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *J Vet Diagn Invest*, 22:270-274.
- Santos, A. P., do Nascimento, N. C., Timenetsky, J. y Messick, J. B. (2014). Comparative genomics and phylogenomics of hemotropic mycoplasmas. *PLoS ONE*, 9(3): e91445. DOI:10.1371/journal.pone.0091445
- Sharifiyazdi, H, Abbaszadeh Hasiri, M., y Amini, A. H. (2014). Intravascular hemolysis associated with *Candidatus Mycoplasma hematoparvum* in a non-splenectomized dog in the south region of Iran. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 5(3), 243–246.
- Soto, F., Walker, R., Sepulveda, M., Bittencourt, P., Acosta-Jamett, G. y Müller, A. (2016). Occurrence of Canine Hemotropic Mycoplasmas in domestic Dogs from urban and rural areas of the Province, Southern Chile. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.013>.
- Rosendal, S. (1974). Canine mycoplasmas: pathogenicity of mycoplasmas associated with distemper pneumonia. *J Infect Dis*, 1974,138:203-210.
- Rosendal, S. (1975). Canine Mycoplasmas: Cultural and Biochemical Studies of Type and Reference Strains. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 83(5), 457- 462.
- Schalm, O.W., Jain, N.C. y Carroll, E.J. (1981). *Materiales y métodos para el estudio de la sangre, incluyendo breves comentarios sobre factores a tener en cuenta en la interpretación de los resultados*. En: Hematología veterinaria. (pp. 15-88). Hemisferio Sur.
- Shaw, S.E., Kenny, M.J., Tasker, S. y Birtles, R.J., (2004). Pathogen carriage by the

- cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) in the United Kingdom. *Vet. Microbiol.* 102, 183-188.
- Razin, S. (1996). Mycoplasmas. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. (4^o ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Soy, J. (2009). *Prevalencia de Mycoplasma suis (Eperythrozoon suis) Infección en cerdos ytrabajadores de granjas porcinas en Shanghai, China.* *Vet Res*, 70,890-894.
- Spickler, A., Rovid, R., James, A. Galyon, J. & Lofstedt, J. (2010). *Emerging and Exotic Diseases of Animals*. (4^o ed.). Iowa State University.
- Steer, J.A, Tasker S, Barker, E.N., Jensen, J., Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V.J. y Hamon, M. (2011). Un nuevo micoplasma hemotrópico (hemoplasma) en un paciente con anemia hemolítica y pirexia. *Clin Infect Dis*, 53, 147-151.
- Steer, J. A., Tasker, S., Barker, E.N., Jensen, J., Kikuth, W. (1928). Ueber einen Neuen Anamieerreger. *Bartonella canis*, nov. sp. *Klin Wochenschr*, 7, 1729-33.
- Sykes, J. E. (2010). Feline hemotropic mycoplasmas. *Vet. Clin. North Am. Small Anim.Pract.* 40:1157-70.
- Sykes, J. E., Lindsay, L., Maggi, R. y Breitschwerdt, E. (2010). Human coinfection with *Bartonellahenselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. *Clin Microbiol*, 48, 3782-5.
- Sykes, J. E., Ball, L. M., Bailiff, N. L. y Fry, M.M. (2005). *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, an ovelsmall, haemotropic mycoplasma from a dog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 55(1), 27-30. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02989-0>
- Taenzler, J., Wengenmayer, C., Williams, H, Fourie, J., Zschiesche, E., Roepke, R. y Heckeroth, A. R. (2014). Onset of activity of fluralaner (BRAVECTO™) against *Ctenocephalides felis* on dogs. *Parasites Vectors* 7, 567. <https://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/567>
- Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., et al. (2005). *Detection of DNA of "Candidatus Mycoplasma haemominutum and Spiroplasma sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan.* *J Vet Med Sci*, 67, 1277-9.

Tártara, G., Pereyra, N., Salvador, F. y González Beltrán, S. (2013).

Detección de estructuras compatibles con micoplasmas hemotróficos en extendidos sanguíneos de perros de la ciudad de Rosario.

Vet.Argentina. 30(299).

Tasker, S., Binns, S. H., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A., Helps, C. R., Jensen, W. A., Olver, C.S. y Lappin, M.R. (2003). Use of aPCR as say to ases the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and „Candidatus *Mycoplasma haemominutum*” in cats the UnitedKingdom. *Vet Rec*,152,193-198.

Tasker, S., Helps, C.R., Day., M.J., Gruffydd-Jones, T.J. y Harbour, D.A. (2003). Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis*and “Candidatus *Mycoplasma haemominutum*” DNA. *Journalof Clinical Microbiology*, 41,439-41.

Tenant, K.V., Barker, E.N., Polizopoulou, Z., Helps, C.R. y Tasker, S. (2011). Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of haemoplasmas in healthy and unhealthy dogs from Central Macedonia,Greece. *J. Small Anim. Pract.*, 52:645- 649.

Tryon, V. V. y Baseman, J. B. (1992) Pathogenic Determinants and Mechanisms. En: Maniloff, J. (ed.). *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. (pp. 457-471). American Society for Microbiology.

Tully, J.G., Bove, J.M., Laigret, F. y Whiscomb, R.F. (1993). Taxonomía revisada de la clase Mollicutes: propuesta de elevación de un grupo monofilético de mollicutes asociados a artrópodos al rango ordinal (Entomoplasmatales ord. nov.), con la provisión de rango familiar paraseparar especies con morfología no helicoidal (Entoplasmataceae granja. nov) de especies helicoidales (Spiroplasmataceae), y descripciones enmendadas del pedido Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae. *Int JSyst Bacteriol*, 43: 378-385.

Tyzzar, E. E. y Weinman, D. (1939). *Haemobartonella* n.g. (*Bartonella* olim proparte), *H. microt* in. sp. of the fieldvole, *Microtus pennsylvanicus*. *Am J Hyg*, 30,141-157.

Ulgen, M.; Cetin, C., Senturk, S., Ozel1, A. E. y Ozdemir, U. (2006).

Urinary Tract Infections due to *Mycoplasma canis* in Dogs. *J. Vet. Med. A*, 53, 379-382.

- Uspensky I, Ioffe-Uspensky I. (2002). The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and nearhuman dwellings. *Int J Med Microbiol*, 291 Suppl 33:156-163.
- Valbuena, G., Bradford, W. y Walker, D.H. (2003). *Expression analysis of the T-celltargeting chemokines CXCL9 and CXCL10 in mice and humans with endothelial infections caused by rickettsiae of the spotted fever group*. *Am J Pathol*. 163:1357-1369.
- Valdivieso-Garcia, A., Rosendal, S., Serebrin, S. (1989). Adherence of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* to cultured endothelial cells. *Zentralbl Bakteriol*, 272, 210-215.
- Venable, J.H. y Ewing, S.A. (1968). Fine structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales Bartonellaceae) and its relation to the host erythrocyte. *Journal of Parasitology*, 54(2), 259-268.
- Warman, S., Helps, C. R., Barker, E. N., Day, K., Sturgess, Day, M. J. y Tasker, S. (2010). Haemoplasma infection is nota common cause of canine immunemediated haemolytic anaemia in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 51, 534-539. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2010.00987
- Welker Biondo, A., Pires dos Santos, A., SáGuimarães, A. M., da Costa Vieira R. F., Vidotto O., de Barros Macieira, D., Pereira Almosny, N.R., Beltrão Molento, M., Timenetsky, J., de Moraes, H. A., Díaz González, F.H. y Messick, J. B. (1984). A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 18(3), 1-7. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01803001>
- Underwood, W. J., Blauwiekel, R., Delano, M. L., Gillesby, R., Mischler, S. A., & Schoell, A. (2015). *Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle*. *Laboratory Animal Medicine*, 623–694. doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8.
- Wengi, N., Willi, B., Boretti, F.S., Cattori, V., Riond, B., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H. y Hofmann-Lehmann, R. (2008). Real-time PCR-based prevalence study,

infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 126, 132- 141.

Wengui, L., Willi, B., Boretti, F., Cattori, V., Riond, B., Meli, M., Reusch, C., Lutz, H. y Hoffman-Lehmann, R. (2008). Real-time PCR based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet Microbiol*, 126,132-141.

Willi B., Boretti F. S., Cattori V., Tasker S, Meli M., Reusch C., Lutz H., y Hofmann-Lehmann R. (2005). Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. American Society for Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (6), 2581-2585. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2581-2585.2005>

Willi, B., Boretti, F., Baumgartner, C., Cattori, V., Meli, M., Doherr, M., Reusch, C. y Hoffman-Lehmann, R. (2006). Feline hemoplasmas in Switzerland: identification of a novel species, diagnosis, prevalence and clinical importance. *Schweiz Arch fur Tierheilkd*, 148(3),139-144.

Willi, B., Novacco, M., Meli, M., Wolf-Jäckel, G., Boretti, F., Wengi, N., Lutz, H. y Hofmann-Lehmann R. (2010). Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. *Schweiz Arch fur Tierheilkd*, 152(5),237-44. <https://doi.org/10.1024/0036-7281/a000055>

Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H. y Hofmann Lehmann, R. (2007). From Haemobartonella to hemoplasma: molecular methods provide new insights. *Vet Microbiol*, 125(3-4),197-209. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.027>

Woods, J.E., Brewer, M.M., Hawley, J.R., Wisniewski, N. y Lappin, M.R., (2005). Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *AJVR*, 66(6), 1008-1012.

DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1008>

- Yuan, C. L., Liang, A. B., Yao, C. B., Yang, Z. B., Zhu, J. G., Cui, L. I., y Hua, X. G. (2009). Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *American journal of veterinary research*, 70(7), 890-894.
- Wang, X., Cui, Y., Zhang, Y., Shi, K., Yan, Y., Jian, F., Zhang, L., Wang, R., y Ning, C. (2017). Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemovis*') in sheep and goats in China. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1062-z>
- Yang, Z., Yuan, C., Yu, F., y Hua, X. (2007). Haemotrophic mycoplasma: review of aetiology and prevalence. *Reviews in Medical Microbiology*, 18, 1–3. doi: 10.1097/MRM.0b013e3282cdf034
- Zachary, J. F. & Smith, A. R. (1985). *Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymfocyte suppression and misdirected immuneresponses*. *Am J Vet Res*, 46, 821-830.
- Zhe Hu, Jigang Yin, Kefei Shen, Wei Kang, and Qijun Chen. (2009)- *Outbreaks of Hemotropic Mycoplasma Infections in China*. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (7), 1139-1140. <https://doi.org/10.3201/eid1507.090174>
- Zhengui, Y., Yan, Z., Liu, J., Chen, T., Cheng, Z., Guo, H., Wang, Z., y Wang, Y. (2009). Treatment of *Mycoplasma wenyonii* Infection in Cows with Imidocarb Dipropionate Injection-acupuncture. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 1 (2). DOI: 10.1016/s2005-2901(09)60035-2
- Zobba, R., Corda, A., Ballocco, I., Sotgiu, F., Alberti, A., Antognoni, M.T. y Pinna Parpaglia, M.L. (2020). Immune-Mediated Hemolytic Anemia Associated with Candidatus *Mycoplasma Haematoparvum* In a Splenectomized dog in Italy. *Acta Veterinaria-Beograd*, 70 (2), 277-284. DOI: 10.2478/acve-2020-0020. *Acta Veterinaria- Beograd* 2020, 70 (2), 277-284.