

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Detección Molecular de *Anaplasma* spp. en perros de zonas rurales tropicales del Ecuador

Mecanismo de Titulación: Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación.

Santiago Xavier Naranjo Rivadeneira

Verónica Barragán T., Ph.D.

Patricio Rojas S., Ph.D.

Directores de Trabajo de Titulación

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Máster en Microbiología

Quito, 12 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Detección molecular de *Anaplasma* spp. en perros de zonas rurales
tropicales del Ecuador**

Santiago Xavier Naranjo Rivadeneira

Nombre del Director del Programa: Patricio Rojas Silva
Título académico: Ph.D.
Director del programa de: Maestría en Microbiología

Nombre del Decano del colegio Académico: Carlos Valle
Título académico: Ph.D.
Decano del Colegio: COCIBA

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados: Hugo Burgos
Título académico: Ph.D.

Quito, 12 de diciembre 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Santiago Xavier Naranjo Rivadeneira

Código de estudiante: 00326900

C.I.: 1803430535

Lugar y fecha: Quito, 12 de diciembre de 2023.

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padrea Marcelo y Cristina por el apoyo inalcanzable brindado en todo momento, sin su acertada guía durante mi vida esto no sería posible, a mis hermanos Marcelo, Felipe y Nicolas. Mis abuelos Elsa, Marcelo y Amalia por enseñarme el valor del trabajo y los estudios. Un agradecimiento especial en el infinito a mi abuelo Jaime, por creer, apoyarme, guiarme y tener toda su fe en mi hasta su ultimo aliento. A mis amigos que supieron presionarme y guiarme en este logro y un agradecimiento muy especial a Darío Cueva y mis amigos en la maestría Ronny, Liz y Majo por su guía y ayuda durante tanto tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Verónica Barragán y Patricio Rojas por guiarme, presionarme y ayudarme durante todo este trayecto, que han sido esenciales para mi crecimiento y desarrollo profesional.

Gracias a Eduardo Diaz de la Escuela de Veterinaria por su apoyo constante, así como al Hospital Tueri y Carolina Sáenz por su gran apoyo con la obtención de muestras.

A todos mis compañeros, profesores y personal del Instituto de Microbiología, por su apoyo y gran labor diaria, un agradecimiento especial a Pamela Mosquera, Sebastián Melo, Santiago Andrade, Gabriela Ortiz por su gran colaboración en el proceso de toma de muestras

Al Centro de Bioinformática USFQ con Mateo Carvajal, Rommel Guevara, Erika Muñoz y Denisse Benítez por su ayuda en el procesamiento de datos.

A la WCS (Wildlife Conservation Society) por su gran apoyo para la toma de muestras en la comunidad Waorani.

Al COCIBA Grant otorgado a Verónica Barragán, por el financiamiento para el procesamiento de las muestras de este proyecto. Al Colegio de Posgrados y en especial a la USFQ por la beca de estudios.

Finalmente, un agradecimiento enorme a mí mismo, ya sea narcisismo, ego o locura por cada día dar un poco más a pesar de las adversidades que pudieron haber quebrado mis ideales de ser lo mejor. Vive cada día como un loco, por que ellos dominan el mundo.

RESUMEN

La anaplasmosis ha sido por décadas una de las infecciones bacterianas desatendidas en caninos y no diagnosticada en humanos. Esta enfermedad es transmitida por garrapatas y se presenta usualmente de forma asintomática o leve en perros y otros mamíferos. La anaplasmosis crónica causa daño orgánico y una alta mortalidad cuando se dan coinfecciones con otros patógenos. Las infecciones humanas por *Anaplasma* spp. han incrementado por la invasión urbana de zonas endémicas de este patógeno. Los reportes de infecciones humanas en sur América han sido muy escasos, al igual que estudios epidemiológicos de vectores, portadores, reservorios y hospedadores de la enfermedad. Las evidencias serológicas sugieren un incremento en la exposición a microorganismos de la familia Anaplasmataceae, demostrando la presencia de la bacteria, así como un ciclo de contagio no controlado en el Ecuador y posiblemente regiones aledañas. Por este motivo se utilizaron técnicas moleculares para determinar la presencia de *Anaplasma* spp. en diferentes zonas rurales tropicales del Ecuador. Los resultados muestran la presencia de *Anaplasma platys* en un 3.79% (n=6) de los perros analizados (n=158). Los datos obtenidos evidencian que la información disponible sobre esta bacteria todavía es limitada. También sugieren que las infecciones humanas y caninas podrían estar sucediendo de manera silenciosa, mostrando la necesidad de realizar más investigación en enfermedades desatendidas provocadas por estos patógenos que podrían causar grandes pérdidas económicas y una alta morbilidad.

Palabras clave: *Anaplasma platys*, perros

ABSTRACT

Anaplasmosis has been for decades one of the neglected bacterial infections in canines and undiagnosed in humans. This disease is transmitted by ticks and usually presents asymptotically or mildly in dogs and other mammals. Chronic anaplasmosis causes organ damage and high mortality when coinfections with other pathogens occur. Human infections by *Anaplasma* spp. have increased due to the urban invasion of endemic areas of this pathogen. Reports of human infections in South America have been very scarce, as have epidemiological studies of vectors, carriers, reservoirs and hosts of the disease. Serological evidence suggests an increase in exposure to microorganisms of the *Anaplasmataceae* family, demonstrating the presence of the bacteria, as well as an uncontrolled contagion cycle in Ecuador and possibly surrounding regions. For this reason, molecular techniques were used to determine the presence of *Anaplasma* spp. in different tropical rural areas of Ecuador. The results show the presence of *Anaplasma platys* in 3.79% (n=6) of the dogs analyzed (n=158). The data obtained show that the information available about this bacterium is still limited. They also suggest that human and canine infections could be happening silently, showing the need for more research into neglected diseases caused by these pathogens that could cause large economic losses and high morbidity.

Keywords: *Anaplasma platys*, dogs

TABLA DE CONTIDO

Resumen.....	7
Abstract.....	8
Indices de Tablas	10
Índice de Figuras	11
Parte1: Revisión de la Literatura	12
Parte 2: Artículo Científico.....	19
Metodología y Diseño de la Investigación.....	23
Resultados	26
Discusión y Conclusiones.....	28
Referencias.....	32
Índice de Anexos	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Datos de control de calidad de Secuenciación	27
Tabla 2 Resumen de resultados muestras	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Árbol filogenético de Rickettsiales y sus familias	22
Figura 2.- Árbol filogenético secuencias analizadas	27

PARTE 1: REVISIÓN DE LA LITERATURA

Rickettsiales es un orden del phylum α -Proteobacteria, estas bacterias son bacilos Gram negativos considerados los más cercanos a las mitocondrias, se caracterizan por ser intracelulares obligatorios, con un genoma $<1.5\text{Mb}$ y poseen un amplio rango de hospedadores desde protistas, mamíferos, artrópodos, entre otros. Al ser intracelulares y seguir un proceso de evolución reductiva, estas bacterias no poseen muchos de los genes para biosíntesis de metabolitos y otros procesos esenciales, por lo que depende en gran cantidad de la maquinaria de la célula a la que infecta para poder replicarse (Brown, 2012; Guccione et al., 2021; Londoño et al., 2023; Patterson et al., 2021; Thomas, 2016). Las principales familias de Rickettsiales (*Anaplasmataceae*, *Rickettsiaceae*, *Midichloriaceae* y *Deianiraeaceae*). Estas bacterias han evolucionado sus ciclos de vida, para ser intracelulares. De la misma manera han evolucionado en vectores específicos para su desarrollo y transmisión (Guccione et al., 2021; Murray et al., 2020; Schön et al., 2022; Thomas, 2016). Las pruebas más comunes para su correcto diagnóstico son la micro inmunofluorescencia y amplificación de ácidos nucleicos, debido a que los cultivos tradicionales no sirven en estas bacterias, debido a sus exigencias nutricionales, como presencia de aminoácidos, incapacidad de usar la glucosa como nutriente, pérdida de genes para la biosíntesis y transporte de nutrientes (Murray et al., 2020; Schön et al., 2022; Tille, n.d.).

Anaplasmataceae

La familia *Anaplasmataceae* consiste principalmente en los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia*. En humanos los patógenos más comunes son: *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum* (anaplasmosis granulocítica humana) y *A. platys* (Anaplasmosis trombocítica)(Londoño et al., 2023; Murray et al., 2020; Pesapane et al., 2019; Thomas, 2016;

Walker & Dumler, 2015). En perros los patógenos más comunes son: *Anaplasma phagocytophilum* (anaplasmosis granulocítica canina), *A. platys* (anaplasmosis trombocítica canina), *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* (El Hamiani Khatat et al., 2021; Pesapane et al., 2019; Vargas-Hernández et al., 2012).

Anaplasma

Las especies patógenas más relevantes tanto para humanos como mamíferos y transmitidas por artrópodos son: *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. platys*, *A. bovis*. Basado en estudios filogenéticos ha se sugerido una clasificación en 2 clados: 1) Eritrocítica (*A. marginale*, *A. ovis*, *A. centrale*) y 2) leucocítica (*A. bovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*), esta clasificación es sugerida en base al tropismo bacteriano, donde cabe destacar que *A. platys* usa a las plaquetas en su ciclo de vida (Oneal et al., 2021; Ybañez & Inokuma, 2016).

En *A. phagocytophilum* una infección exitosa dependerá de la dosis infectiva que el hospedador reciba en la inoculación (Fourie et al., 2019). La incubación de la enfermedad será de 4-7 días. En las primeros 72 a 96 horas no se detecta bacteriemia en sangre periférica; pero hay evidencia que sugiere replicación en células pulmonares o del bazo (Woldehiwet, 2010), se ha visto que posiblemente las células endoteliales vasculares estén involucradas en la infección inicial y en infecciones persistentes (Wang et al., 2015). Por lo general la bacteria ingresa a neutrófilos en humanos y mamíferos a través de un fagosoma, mediado por una proteína de invasión A (AipA), proteína de superficie (Asp14) y una proteína de membrana externa (OmpA) que guían a una entrada optima, siendo AipA y Asp14 los antígenos que se busca crear anticuerpos. La adhesión se dará con la selectina PSGL-1 que tendrá α 2,3-acido siálico y α 1,3-fucosa del sLe^x (tetrasacárido de Lewis). El sistema de secreción tipo 4 con la proteína ankyrin A (AnkA) se unirá al interactor-Abl-1 (Abi-1) que resultará en la fosforilación

de AnkA y activación del complejo regulador WAVE, que resultará en la formación del endosoma, que será una de los primeros mecanismos de evasión del sistema inmune innato, junto con la ausencia de lipopolisacárido y peptidoglicano. Se van a replicar dentro de los fagosomas hasta crear masas llamadas mórulas (se consideran específicas como diagnóstico microscópico). La infección producirá el bloqueo de funciones clave del neutrófilo como: actividad antimicrobiana, estallido oxidativo, apoptosis, marginación vascular, emigración y fagocitosis. La liberación de bacterias se da por lisis celular (Londoño et al., 2023; Murray et al., 2020; Patterson et al., 2021). Estas bacterias al igual que *Rickettsia* dependen de la maquinaria celular para ayudar en su replicación, ya que carecen de muchos genes claves para producir elementos estructurales (El Hamiani Khatat et al., 2021; Martínez Díaz et al., 2023; Murray et al., 2020; Pesapane et al., 2019).

Los síntomas no suelen ser específicos, lo que confunde su diagnóstico diferencial, pero se incluyen fiebre, malestar, mialgia y anorexia dentro de los más comunes (MacQueen & Centellas, 2022; Murray et al., 2020). En los caninos los síntomas más usuales serán fiebre alta, malestar, mialgia, leucopenia, trombocitopenia, elevadas transaminasas hepáticas y anorexia. No todos los síntomas suelen presentarse y puede haber una cronicidad que puede llegar a años (El Hamiani Khatat et al., 2021; Kohn et al., 2008; Murray et al., 2020; Pesapane et al., 2019; Poitout et al., 2005). Sin embargo hay reportes donde se menciona que la infección es muy corta para que sirva de reservorio o al vector en su ciclo (*A. phagocytophilum*), pero esto ha sido considerando infecciones sintomática, por cuanto hay una discrepancia grande entre el porcentaje de seroprevalentes, perros enfermos y perros positivos por PCR pero asintomáticos (Beall et al., 2008; Bowman et al., 2009; Foley et al., 2001; Kohn et al., 2008), hay una variación en la severidad desde formas subclínicas hasta formas severas, con

infecciones agudas que usualmente están asociadas a coinfecciones y diferencias en la patogenicidad de la cepa (Beall et al., 2008; Mazepa et al., 2010; Poitout et al., 2005; Ravnik et al., 2011; Silaghi et al., 2011); otros estudios mencionan que depende del área donde reside el animal y el cuidado veterinario que se tenga para el control de garrapatas. Hay reportes que muestran que los perros y garrapatas en el animal sirven de reservorio de más de una especie de *Anaplasma* (El Hamiani Khatat et al., 2021; Lu et al., 2019; Zhao et al., 2021).

La gravedad de las infecciones humanas varía en función de la especie, siendo leves en caso de *A. platys*, pero en *A. phagocytophilum* la evidencia sugiere que alrededor de 36% de las infecciones requieren hospitalización, 17% de hospitalizados requiere cuidados intensivos y una mortalidad menor al 1%, un correcto diagnóstico será clave para la mejora rápida del paciente (Breitschwerdt et al., 2014; MacQueen & Centellas, 2022). Los vectores caninos de estas bacterias son usualmente garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus* y *Amblyomma* (El Hamiani Khatat et al., 2021; Miranda & Mattar, 2015; Pesapane et al., 2019; Vargas-Hernández et al., 2012).

La prevalencia de *Anaplasma.spp* en caninos en Ecuador se ha dado de forma muy breve en proyectos de tesis realizados zonas urbanas como Guayaquil o Manabi, pero usando técnicas de Micro ELISA, las cuales no diferencian entre *A.platys* y *A. phagocytophilum*, o en otros casos solo se diagnosticó la enfermedad por medio de la observación de frotis sanguíneos de perros con o sin sintomatología presuntiva (Davalos & Melchiade, 2018; Letamendi, 2020; Zambrano, 2019). Otros estudios detectaron la presencia de *Anaplasma* en animales salvajes, pero de igual forma por medio de métodos ópticos (Diaz et al., 2021). El único estudio en perros donde se detectó un caso de *Anaplasma* por medio de PCR fue en las islas Galápagos, y

previamente se detectó por medio de ELISA en el mismo lugar (Jimenez et al., 2020; Levy et al., 2008). Existen estudios en Colombia en zonas de climas tropicales donde la seropositividad de *Anaplasma* es alrededor de 16%, pero se encontró que todos los animales de igual forma eran seropositivos para *Ehrlichia*, La cantidad de positivos entre áreas rurales y urbanas no fue diferente, pero no se pudo saber las especies predominantes en los animales infectados (Bonilla-Aldana et al., 2022). En estudios de áreas urbanas se pudo ver una positividad del 13% por medio de PCR y 3.5% por medio de microscopía, siendo *A. platys* y *A. phagocytophilum* las principales especies detectadas por secuenciación. (Bonilla-Aldana et al., 2022; Katterine Bonilla-Aldana et al., 2020).

A. platys usualmente transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Breitschwerdt et al., 2014), es una bacteria que parasita plaquetas de forma obligatoria en animales, siendo descrita en Florida, USA por primera vez y después siendo descrita la enfermedad en humanos (Katterine Bonilla-Aldana et al., 2020), Infecciones por *A. platys* han sido detectadas en contadas ocasiones en humanos, pero se cree que las mismas suelen ser de sintomatología moderada, por lo que en coinfección los síntomas suelen ser más evidentes, pero se puede distinguir que sintomatología pertenece a que patógeno. Se ha confirmado infecciones en Venezuela, donde 2 pacientes desarrollaron síntomas como: poco apetito, debilidad general, dolor muscular crónico, fatiga, y dolores de cabeza ocasionales. Síntomas que duraron desde meses hasta años. Ambos casos poseían perros domésticos a los cuales se encontró infestados con garrapatas de *R. sanguineus*, uno de ellos encontró garrapatas y sus mordidas en su cuerpo, y otro caso en Estados Unidos donde una paciente y su hija desarrollaron síntomas similares a los descritos anteriormente, incluidos edema y elevadas enzimas hepáticas. Se demostró que había una coinfección, con una similaridad de secuencias del 99.9%, 99.7% y

99.7% respectivamente con *A. platys*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, entre las pacientes y el canino doméstico . Los patógenos habrían sido contagiados desde garrapatas (*R.sanguineus* o *Amblyomma americanum*) del perro doméstico a las pacientes, basado en la evidencia. (Arraga-Alvarado et al., 2014; Breitschwerdt et al., 2014).

Secuenciamiento

La secuenciación de genes a través de la plataforma Oxford Nanopore Technologies es de gran utilidad debido a su compacto tamaño y la capacidad de leer pequeñas y grandes secuencias de genes bacterianos (Johnson et al., 2019)(Johnson et al., 2019) El gen 16s rRNA debido a su alta conservación en una especie y alta variabilidad entre especies es una gran herramienta para el diagnóstico y detección de diferentes especies bacterianas. Mientras más largo sea el fragmento analizado, más informativa será la secuencia para el análisis filogenético o predicción familiar de nuevas especies bacterianas.(Huggins, Colella, Koehler, et al., 2022; Vasconcelos et al., 2021)La secuenciación por medio de esta plataforma brinda muchos beneficios debido a la secuenciación de grandes secuencias, siendo una ventaja frente a otras plataformas. Una de las desventajas es la profundidad de la secuenciación debido al numero de lecturas por muestra que pueden dar otras plataformas como Illumina que pueden brindar una información de mayor profundidad, pero con limitaciones al momento del procesamiento de secuencias muy largas (Ben Khedher et al., 2022; Ciuffreda et al., 2021; Huggins, Colella, Atapattu, et al., 2022; Kai et al., 2019; Karst et al., 2021; Rozas et al., 2022a, 2022b).

Rickettsiaceae

La familia *Rickettsiaceae* consiste en los géneros *Rickettsia* y *Orientia*. El género *Rickettsia* esta compuesto por 2 grupos: spotted fever group dentro del cual podemos encontrar *Rickettsia*

rickettsii en America del Norte, *R. africae* en África subsahariana, *R. conorii* Europa y Norte de África. El typhus group con *R. prowazekki* en Africa, Asia, Centro y Sur América y *R. typhi* (Guccione et al., 2021; Murray et al., 2020; Thomas, 2016; Tille, n.d.). En perros *R. rickettsii* es la especie más comúnmente encontrada (Martínez Díaz et al., 2023), a pesar de que la enfermedad no es tan común en los caninos, como lo es en humanos, teniendo en cuenta que ambos suelen ser hospedadores accidentales (Murray et al., 2020; Tille, n.d.). Los vectores del grupo spotted fever son garrapatas duras comúnmente encontradas en perros o madera y ácaros, mientras que para el grupo typhus los vectores y reservorios más comunes son piojos y pulgas. Ambos grupos de vectores han sido reportados como presentes en sur América, posiblemente siendo vectores de más de una enfermedad del orden Rickettsiales, pero sin reportar detalles de la presencia de las bacterias (Guccione et al., 2021; Murray et al., 2020; Pesquera et al., 2015; Thomas, 2016; Tille, n.d.).

PARTE 2: ARTÍCULO CIENTÍFICO

En el phylum Pseudomonadota (antes conocido como Proteobacteria), en la clase Alphaproteobacteria está el orden Rickettsiales (Figura 1), tiene 2 familias importantes: 1) *Anaplasmataceae*, donde están los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia*, y 2) *Rickettsiaceae* con *Rickettsia* y *Orientia* que son importantes causantes de enfermedades febriles transmitidas por vectores tanto en humanos como en animales (Diaz et al., 2021; Guccione et al., 2021; Londoño et al., 2023; Thomas, 2016). Estas bacterias son hemoparásitos intracelulares que suelen causar co-infecciones entre ellas o con otros patógenos como bacterias, parásitos o virus, (Bakken & Dumler, 2015; Londoño et al., 2023). Los principales vectores son garrapatas y en menor proporción piojos, pulgas, y ácaros, siendo los perros los reservorios más comunes (Murray et al., 2020; Thomas, 2016).

Las especies patógenas más reconocidas en humanos son *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum*. La mayor parte de la información disponible hace referencia a América del Norte, Europa y en menor cantidad a América del sur, Asia y África (Guccione et al., 2021; Murray et al., 2020; Snowden et al., 2023; Thomas, 2016). La distribución es global, pero las especies causantes de enfermedad y sus vectores varían dependiendo del país y continente, siendo usualmente verano y primavera las épocas más comunes (Murray et al., 2020; Pesapane et al., 2019; Thomas, 2016) Hay contadas evidencias de infecciones humanas por *A. platys*, una de ellas demostró el hallazgo de la misma bacteria en un perro doméstico y el dueño del animal como una dolencia crónica,

además mostró coinfección con *E. chaffeensis* (Arraga-Alvarado et al., 2014; Breitschwerdt et al., 2014). Los patógenos caninos de esta familia de bacterias comúnmente detectados son: *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *R. rickettsii* (Atif, 2015; Guccione et al., 2021; Jimenez et al., 2020; Katterine Bonilla-Aldana et al., 2020; McCown et al., 2014; Otalora et al., 2022; Pesapane et al., 2019). La investigación acerca de estas enfermedades en perros ha sido muy limitada en el Ecuador, hay pocos estudios que muestran evidencia de la presencia de estos patógenos usando principalmente métodos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y en pocas ocasiones PCR (polymerase chain reaction) (Jimenez et al., 2020; Levy et al., 2008). El uso de ELISA y técnicas de observación en placa genera pérdidas de información debido a que las pruebas agrupan varias especies en su diagnóstico y tienen reacción cruzada con otros patógenos, mientras que el uso de PCR se ha visto limitado muchas veces a especies específicas o en otras especies lo que ha limitado la información en caninos (Diaz et al., 2021; Guarnizo et al., 2020; Jimenez et al., 2020; Levy et al., 2008; Pesquera et al., 2015).

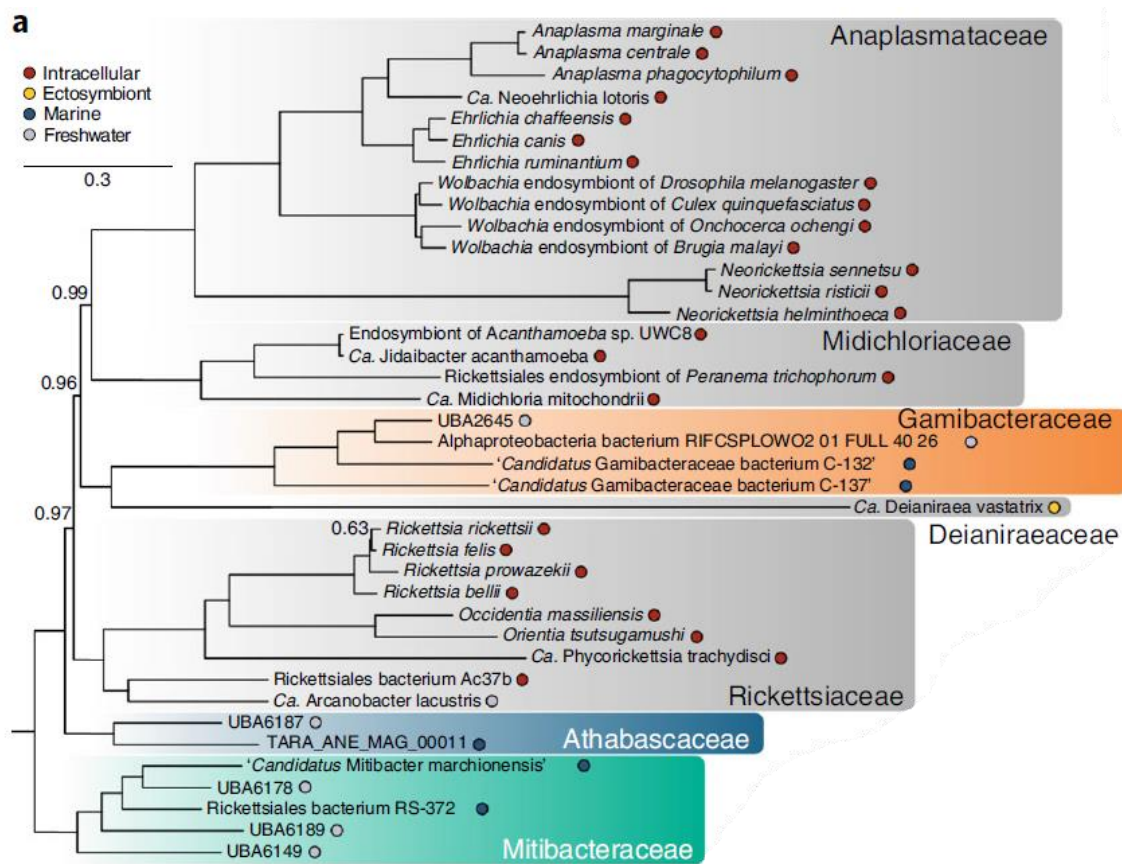
La limitada información disponible en caninos, de los patógenos de la familia *Anaplasmataceae* en áreas rurales tropicales, ha sido generada por métodos serológicos y por PCR en las islas Galápagos (Jimenez et al., 2020; Levy et al., 2008). En Ecuador continental los métodos diagnósticos muchas de las veces fueron realizados en proyectos de tesis u otros proyectos donde la información obtenida no puede ser verificada más allá de pruebas inmunológicas o pruebas clásicas usando microscopia, que tienen menor sensibilidad (Davalos & Melchiade, 2018; Letamendi, 2020; Zambrano, 2019). En el Ecuador no se ha encontrado evidencia bibliográfica de proyectos de investigación que apliquen PCR o posterior secuenciación para

verificar la presencia, género y posibles especies que están circulando en perros en las zonas del presente estudio.

Debido al clima, estatus socio-económico y evidencia de estudios en Colombia se cree que los perros actúan como reservorio de los patógenos del género *Anaplasma* (Bonilla-Aldana et al., 2022; Katterine Bonilla-Aldana et al., 2020; Martínez Díaz et al., 2023; Miranda & Mattar, 2015; Otalora et al., 2022; Pesapane et al., 2019; Vargas-Hernandez et al., 2016). Por lo que es importante investigar la presencia de este género, así como su ciclo de transmisión en la naturaleza, y los riesgos en salud y pérdidas económicas que generan en los animales afectados. En el Ecuador no se dispone de métodos de diagnóstico de enfermedades causadas por estas bacterias en humanos o la infección suele ser confundida por otras patologías con sintomatología febril similar, aumentando el riesgo que generan las infecciones no diagnosticadas de *Anaplasma* spp. en humanos y caninos y su posible cronicidad. La salud animal es afectada en diferentes niveles cuando los perros padecen estas enfermedades. La infección por una sola especie usualmente causa enfermedad asintomática y después crónica que puede durar años, con alteraciones en los conteos hematológicos y altas transaminasas hepáticas; pero en animales donde se ha encontrado *Anaplasma* spp. en coinfecciones con *Ehrlichia*, *Babesia*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y otros patógenos han mostrado causar síntomas como: falla renal, neumonía, vomito, sangrado, alteraciones neurológicas (Breitschwerdt et al., 2014; El Hamiani Khatat et al., 2021; Pesapane et al., 2019; Rueda-Concha et al., 2022; Vargas-Hernandez et al., 2016)

Por lo tanto, determinar la presencia o ausencia de *Anaplasma* spp. en perros ayudará al diagnóstico, comprensión de la epidemiología, ciclo de transmisión y generará una base para futuras investigaciones. Por lo que, el objetivo de este estudio fue detectar, con técnicas

moleculares, la presencia de *Anaplasma* spp. en sangre de perros de zonas rurales tropicales del Ecuador.



(Schön et al., 2022)

Figura 1.- a) Relación filogenética de las familias bacterianas pertenecientes al orden Rickettsiales, donde se puede ver con puntos de color: rojos intracelulares, amarillo ectosimbionte, azul ambiente marino y gris agua dulce.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Este estudio es parte de un proyecto de investigación más amplio que busca múltiples hemoparásitos que afectan animales domésticos en zonas rurales tropicales del Ecuador. Liderado por los profesores de la USFQ de Verónica Barragán, Eduardo Díaz, y Patricio Rojas Silva quienes supervisan a múltiples estudiantes que colaboran en el desarrollo el proyecto.

Sitios de Estudio

Muestras de sangre de 158 perros se colectaron de 2019 a 2022 en 5 provincias del Ecuador. En agosto 2019 en Napo se colectaron 52 muestras de las comunidades: Pompeya (n=11), San Roque (n=12), Sani Isla(n=12), Nueva Providencia(n=12) e Indillama (n=5), en noviembre 2021 en Orellana 44 muestras del Parque Nacional Yasuní. En mayo y noviembre de 2022 en Manabí 15 y 16 muestras respectivamente del cantón Rocafuerte, en junio 2022 en Esmeraldas 7 muestras de la parroquia Las Peñas, en diciembre 2022 en Pichincha 22 muestras de la parroquia Mindo y 2 de la ciudad de Quito. Las muestras fueron tomadas con el consentimiento del dueño del animal.

Se utilizo tubos con EDTA para tomar y conservar las componentes celulares debido a la naturaleza intracelular de la bacteria, posteriormente colocadas en frio y transportadas al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, donde se almaceno a -20°C para su posterior procesamiento.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de sangre se realizó con el Kit PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen, Ca, USA), se usó 200uL de muestra y se siguió el protocolo de

acuerdo con las especificaciones del fabricante para muestras de sangre, el ADN obtenido se almaceno a -20°C para posteriores pruebas moleculares.

Detección molecular de *Anaplasma* spp.

La presencia de ADN de bacterias patógenas de la familia Anaplasmataceae fue probada en todas las muestras. Para verificar la ausencia de inhibidores de PCR, verificar la calidad de la extracción y descartar la probabilidad de falsos negativos se realizó PCR de β -actina (du Breuil et al., 1993) en 25 muestras (15.8%). La detección de *Anaplasma* spp., se realizó por medio de una PCR que amplifica un fragmento (1178pb) del gen 16S rRNA de la familia Anaplasmataceae (ANA-16S-F2: TGGCAGACGGGTGAGTAATG y ANA-16S-R2: AGAGRACAATCCGAACTGAG) (Gajadhar et al., 2010). Como control positivo se utilizó ADN de *Anaplasma* confirmado por PCR y secuenciación perteneciente a una investigación previa y como control negativo se usó agua ultrapura. Las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 10uL, usando 0.37u/rxn de DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), 1x de DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), 0.15uM de primers ANA-16S-F2 y ANA-16S-R2, 0.20mM de dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) y 20ng de ADN. Con las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de (94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 72°C por 1:15 minutos) y una extensión final de 72°C por 5 minutos usando el termociclador Bio-Rad T100. Los amplicones fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% por 40 minutos y su posteriormente visualizados usando el transiluminador UV Bio-Rad. Las muestras que generaron un amplicón de 1178pb (pares de bases) fueron consideradas positivas.

Identificación de especies de Anaplasma

Secuenciamiento

Por medio de la PCR mencionada anteriormente, 44 muestras fueron positivas, de las cuales 20 poseían la calidad requerida para secuenciación. Se realizó una limpieza inicial con AMPure XP beads (Beckman Coulter, CA, USA). Los amplicones fueron normalizados a una concentración de 20 ng/μL, se mezcló 12.5uL de librería de ADN, 25.5uL de Loading Beads (LB) 25.5 de buffer de secuenciación (SBQ). Se colocó 75uL de la librería preparada en la Celda de Flujo para secuenciar. Se secuenciaron utilizando la tecnología de Oxford Nanopore con el kit “Ligation Native Barcoding”, que fue usado para secuenciación multiplex de varias muestras en una celda, con identificadores genómicos diferentes para cada muestra. Se cargó un total de 18 ng/μL de la biblioteca en una MinION 25mpl cell (FLO-MIN 106). La mayor cantidad de lecturas (reads) se obtuvo después de 24 horas de secuenciación. Las lecturas se demultiplexaron utilizando el software Guppy (versión 3.4.5) y Porechop (versión 0.2.4).

Análisis bioinformático de secuencias

Se empleó el protocolo “Amplicón sorter” en la línea de comandos para crear una secuencia consenso basado en la similaridad y tamaño de los amplicones (Vierstraete & Braeckman, 2022). En este caso, no se utilizó una referencia, sino que esta herramienta generó una secuencia consenso basada en la similitud y la longitud de la secuencia. Posteriormente, esta secuencia consenso se comparó con genomas representativos disponibles en la base de datos GenBank (Benson et al., 2012).

Análisis Filogenético de las secuencias de *Anaplasma* spp. obtenidas.

Las secuencias de *Anaplasma* spp. recuperadas de muestras positivas del gen 16s rRNA, se compararon y alinearon con secuencias de referencia tomadas GenBank usando MAFFT (versión 7 Online) (parámetros por defecto). El árbol filogenético y el análisis previo para determinar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos a usar se realizó en Mega versión 11.0, se utilizó Maximum Likelihood (ML) y GTR + G +I como modelo de sustitución de nucleótidos. Para elaborar el árbol filogenético uso 100 réplicas como Bootstrap para evidenciar el soporte de cada nodo generado.

RESULTADOS

La amplificación del fragmento del gen 16s rRNA de la familia Anaplasmataceae muestran que, de las 158 muestras, 27.84% (44 muestras) resultaron positivas para el fragmento de 1178pb. El detalle de los resultados se muestran en la **Tabla 2**. De estas 44 muestras, se lograron secuenciar los amplicones de 20. De estas, 6 muestras fueron identificadas como *Anaplasma* spp. con una profundidad 292 a 1000 secuencias. La media y la mediana comparten valores similares en las muestras 07-13-17-18, mientras que en el resto de las muestras se ve una diferencia, no relevante. Los valores de N50 de todas muestras están cerca del tamaño del amplicón, y muestran la longitud apropiada de las secuencias que apoya la identificación de las secuencias. El Phred score osciló entre 19 y 20 en todas las muestras siendo un claro indicador de la buena calidad de las secuencias analizadas

	Barcode06 (G67)	Barcode07 (G68)	Barcode10 (G47)	Barcode13 (G52)	Barcode17 (G61)	Barcode18 (G70)
Profundidad	292,00	1000,00	997,00	347,00	1001,00	998,00
N50	1162,00	1164,00	1158,00	1165,00	1168,00	1163,00
PHRED score	20,00	20,00	19,00	19,00	20,00	20,00

Tabla 1: Información de Secuenciación.

Las muestras G047, G052, G061, G067, G068 y G070 (6 muestras), provenientes de Rocafuerte, provincia de Manabí obtuvieron una similitud del 100% con *Anaplasma platys*. Esta identificación fue confirmada al realizar un árbol filogenético del fragmento (Bootstrap de 98) obtenido en el que se incluyeron otras especies del género (**Figura 2**).

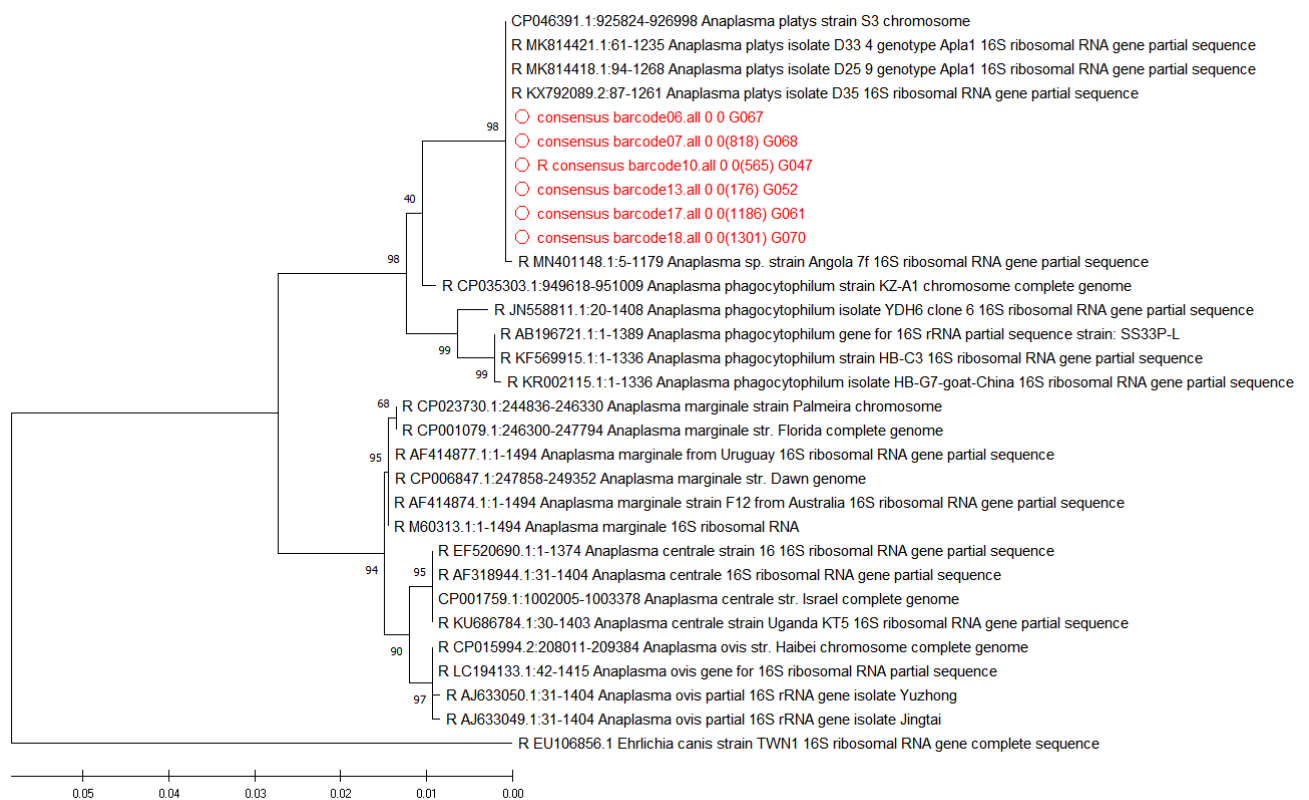


Figura 2: Árbol filogenético que muestra en rojo las secuencias aisladas de *A. platys* en la localidad de Rocafuerte en la provincia de Manabí. Se usó *Ehrlichia canis* como outgroup para realizar el árbol.

Resumen de resultados						
Detección Molecular de <i>Anaplasma</i> en perros de Ecuador						
Lugar Muestreo	Provincia	Muestras analizadas	Positivos Anaplasmataceae PCR*	% Positividad Anaplasmataceae	Positivos Anaplasma secuenciación	% Positividad Anaplasma
Yasuni	Orellana	44	17	38,64%		0,00%
Rocafuerte	Manabi	31	17	54,84%	6	19,35%
Las Peñas	Esmeraldas	7	4	57,14%		0,00%
Mindo	Pichincha	24	2	8,33%		0,00%
Rio-Napo	Napo	52	4	7,69%		0,00%
Total		158	44	27,85%		

Tabla 2: Tabla resumen de resultados obtenidos

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las infecciones por bacterias del género *Anaplasma* en humanos son comúnmente causadas por *A. phagocytophilum*, estas producen anaplasmosis granulocítica humana y la mayor parte de casos reportados se dan en países desarrollados (Guccione et al., 2021; MacQueen & Centellas, 2022; Thomas, 2016; Uminski et al., 2018), mientras que en países en vías de desarrollo como Ecuador el diagnóstico es nulo y los estudios epidemiológicos en animales se han limitado a bovinos y caninos domésticos y especies con poco contacto humano (Davalos & Melchiade, 2018; Diaz et al., 2021; Guarnizo et al., 2020; Letamendi, 2020; Zambrano, 2019). Investigaciones en países vecinos han detectado molecularmente la presencia de *A. platys*, de forma regular en varias zonas del territorio Colombiano, más frecuentemente en zonas tropicales urbanas y rurales, con una mayor prevalencia en zonas socio económicas bajas o condiciones de hacinamiento con animales, pero comúnmente se ha reportado que tanto *A. platys* como *A. phagocytophilum* están causando coinfecciones con otras bacterias o parásitos como *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. y otras; que cuando la infección se presenta solo *Anaplasma* puede llegar a ser crónica con sintomatología leve, pero en casos de

coinfección la enfermedad suele ser invasiva y hasta mortal (Bonilla-Aldana et al., 2022; Eraso-Cadena et al., 2018; Faccini-Martínez et al., 2017; Katterine Bonilla-Aldana et al., 2020; Martínez Díaz et al., 2023; McCown et al., 2014; Otalora et al., 2022; Pesapane et al., 2019; Vargas-Hernandez et al., 2016).

En recientes años se ha reportado la infección humana por *A. platys*, en ocasiones la bacteria por sí sola y en otras ocasiones en coinfección con otros miembros del orden *Rickettsiales*, pero más importante aún es que se ha confirmado que los pacientes infectados poseían genéticamente la misma bacteria que el animal doméstico. En los casos detectados tanto en Venezuela como en Estados Unidos se ha visto que perros infectados por *A. platys* por sí solo o co-infectados por otros *Rickettsiales* han sido capaces de causar enfermedad sintomatológica, que ha tenido como consecuencia hospitalizaciones y pérdida de vidas, es relevante mencionar que los pacientes estaban sanos y no tenían patologías alternas que causen sensibilidad, por lo que existe una razonable posibilidad que casos de anaplasmosis estén dándose más regular de lo reportado en las zonas rurales del país tanto en humanos, caninos y otros mamíferos que sirven de hospederos del patógeno (Arraga-Alvarado et al., 2014; Breitschwerdt et al., 2014), por lo que los resultados de este estudio dan luces, de que es necesaria más investigación de posibles infecciones humanas, caninas y de mamíferos portadores que podrían estar causando infecciones febriles de sintomatología inespecífica. Hay un reporte en la ciudad de Machala en la provincia del Oro, de (Farovitch et al., 2019) que menciona la presencia de anticuerpos IgG e IgM de *Rickettsiales* (*Anaplasma*, *Rickettsia* y *Ehrlichia*) en humanos, con un 25% de pacientes mostrando anticuerpos y un 8% mostrando IgM, de igual forma se vio la presencia de arbovirus coinfectando pacientes; por lo que al demostrar la presencia de *A. platys* en zonas rurales tropicales, junto que el reporte mencionado, muestran que infecciones por *Anaplasma*

platys y otros patógenos que co-infecten pacientes podrían ser comunes y mas riesgosos de lo pensado en zonas donde los vectores tienen gran presencia en el Ecuador.

Los primers usados amplifican bacterias de los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* por lo que las muestras positivas que no son del género *Anaplasma*, dan importante información acerca de la presencia de los otros géneros que están circulando e infectando a caninos de las zonas de estudio. El hallazgo de secuencias de *Anaplasma platys* en caninos de la provincia de Manabí reportadas en este estudio, es el primer reporte especie bacteriana en perros del país mediante detección molecular. Estos resultados dan luces sobre la distribución del patógeno que ha sido previamente encontrado en vacas y muestran la falta de información de la epidemiología, diagnóstico, prevención, ciclo de vida de las bacterias, vectores biológicos, transmisión de la bacteria en mamíferos, reservorios y sus respectivos vectores biológicos o mecánicos. El análisis filogenético (**Figura 2**) del gen 16s rRNA, muestra con una similaridad del 100%, que las secuencias encontradas ya han sido reportadas previamente en países como Cuba, San Cristóbal y Nieves, Portugal, Turquía y muchos otros en Europa, Asia y África (Hofmann-Lehmann et al., 2016; Llanes & Rajeev, 2020; Silva et al., 2016; Vlahakis et al., 2018), mostrando a nivel de 16s rRNA que hay una distribución global del patógeno.

Los resultados del estudio denotan una positividad de 27.85% (n=44), siendo solamente positivos para *Anaplasma* el 3.79% (n=6) de un total de 158 muestras. La presencia de animales positivos en Rocafuerte, siendo una zona rural donde el contacto de los caninos, con otros animales de producción evidencia un riesgo socioeconómico, debido a la posibilidad de contagio de *A. platys* y otros patógenos transmitidos por garrapatas comúnmente encontrados en caninos. Nuevas infecciones de *Anaplasma spp.* en otras especies de animales genera posibles

riesgos de salud debido a que los mismos se crían para el consumo humano. La infección canina por *A. platys* suele ser considerada la infección crónica o subclínica más común en perros, la evidencia en Colombia sugiere que la presencia de otras especies de *Anaplasma* es muy posible (Bonilla-Aldana et al., 2022; Otorora et al., 2022; Pesapane et al., 2019). Los resultados de la secuenciación dan evidencia de una prevalencia un tanto baja. Es importante investigar caninos y mamíferos domésticos que pueden ser portadores, así como las garrapatas que portan, contrastando la información y ayudando a esclarecer las posibles infecciones que pudieren estar siendo confundidas enfermedades febriles en el Ecuador.

REFERENCIAS

- Arraga-Alvarado, C. M., Qurollo, B. A., Parra, O. C., Berrueta, M. A., Hegarty, B. C., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Case report: Molecular evidence of anaplasma platys infection in two women from venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), 1161–1165. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>
- Atif, F. A. (2015). Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. In *Parasitology Research* (Vol. 114, Issue 11, pp. 3941–3957). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2>
- Bakken, J. S., & Dumler, J. S. (2015). Human Granulocytic Anaplasmosis. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 29, Issue 2, pp. 341–355). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.007>
- Beall, M. J., Chandrashekar, R., Eberts, M. D., Cyr, K. E., Diniz, P. P. V. P., Mainville, C., Hegarty, B. C., Crawford, J. M., & Breitschwerdt, E. B. (2008). Serological and Molecular Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* Species in Dogs from Minnesota. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 455–464. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0236>
- Ben Khedher, M., Ghedira, K., Rolain, J.-M., Ruimy, R., & Croce, O. (2022). Application and Challenge of 3rd Generation Sequencing for Clinical Bacterial Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1395. <https://doi.org/10.3390/ijms23031395>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bonilla-Aldana, D. K., Gutiérrez-Grajales, E. J., Martínez-Arboleda, J. P., Reina-Mora, M. A., Trejos-Mendoza, A. E., Pérez-Vargas, S., Valencia-Mejía, L., Marín-Arboleda, L. F., Osorio-Navia, D., Chacón-Peña, M., González-Colonia, L. V., Cardona-Ospina, J. A., Jiménez-Posada, E. V., Diaz, A., Salazar, J. C., Sierra, M., Muñoz-Lara, F., Zambrano, L. I., Ramírez-Vallejo, E., ... Rodríguez-Morales, A. J. (2022). Seroprevalence canine survey for selected vector-borne pathogens and its relationship with poverty in metropolitan Pereira, Colombia, 2020. *Parasite Epidemiology and Control*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00249>
- Bowman, D., Little, S. E., Lorentzen, L., Shields, J., Sullivan, M. P., & Carlin, E. P. (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.093>
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Qurollo, B. A., Saito, T. B., Maggi, R. G., Blanton, L. S., & Bouyer, D. H. (2014). Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>
- Brown, W. C. (2012). Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.002>

- Ciuffreda, L., Rodríguez-Pérez, H., & Flores, C. (2021). Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1497–1511. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.020>
- Davalos, C., & Melchiade, J. (2018). “*Diagnóstico de ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariosis y enfermedad de Lyme y caracterización de vectores en caninos callejeros del sector Guasmo Sur – Guayaquil.*”
- Diaz, E., Hidalgo, A., Villamarin, C., Donoso, G., & Barragan, V. (2021). Vector-borne zoonotic blood parasites in wildlife from Ecuador: A report and systematic review. In *Veterinary World* (Vol. 14, Issue 7, pp. 1935–1945). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1935-1945>
- du Breuil, R. M., Patel, J. M., & Mendelow, B. V. (1993). Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *Genome Research*, 3(1), 57–59. <https://doi.org/10.1101/gr.3.1.57>
- El Hamiani Khatat, S., Daminet, S., Duchateau, L., Elhachimi, L., Kachani, M., & Sahibi, H. (2021). Epidemiological and Clinicopathological Features of Anaplasma phagocytophilum Infection in Dogs: A Systematic Review. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.686644>
- Eraso-Cadena, M. P., Molina-Guzmán, L. P., Cardona, X., Cardona-Arias, J. A., Ríos-Osorio, L. A., & Gutierrez-Builes, L. A. (2018). Serological evidence of exposure to some zoonotic microorganisms in cattle and humans with occupational exposure to livestock in Antioquia, Colombia. *Cadernos de Saude Publica*, 34(10). <https://doi.org/10.1590/0102-311x00193617>
- Faccini-Martínez, Á. A., Ramírez-Hernández, A., Barreto, C., Forero-Becerra, E., Millán, D., Valbuena, E., Sánchez-Alfonso, A. C., Imbacuán-Pantoja, W. O., Cortés-Vecino, J. A., Polo-Terán, L. J., Yaya-Lancheros, N., Jácome, J., Palomar, A. M., Santibáñez, S., Portillo, A., Oteo, J. A., & Hidalgo, M. (2017). Epidemiology of spotted fever group rickettsioses and acute undifferentiated Febrile Illness in Villeta, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 782–788. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0442>
- Farovitch, L., Sippy, R., Beltrán-Ayala, E., Endy, T. P., Stewart-Ibarra, A. M., & Leydet, B. F. (2019). Detection of Antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae and Arboviral Coinfections in Febrile Individuals in 2014–2015 in Southern Coastal Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(5), 1087–1090. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0157>
- Foley, J. E., Foley, P., & Madigan, J. E. (2001). Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. *American Journal of Veterinary Research*, 62(10), 1599–1605. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1599>
- Fourie, J. J., Evans, A., Labuschagne, M., Crafford, D., Madder, M., Pollmeier, M., & Schunack, B. (2019). Transmission of Anaplasma phagocytophilum (Foggie, 1949) by Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758) ticks feeding on dogs and artificial membranes. *Parasites & Vectors*, 12(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3396-9>
- Gajadhar, A. A., Lobanov, V., Scandrett, W. B., Campbell, J., & Al-Adhami, B. (2010). A novel Ehrlichia genotype detected in naturally infected cattle in North America. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.034>
- Guarnizo, T. R. M., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Cabezas-Cruz, A., Gutiérrez, L. Z., Marrero, S. M., & Corona-González, B. (2020). Epidemiology and genetic diversity of

- Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchi, Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(3). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101380>
- Guccione, C., Colomba, C., Tolomeo, M., Trizzino, M., Iaria, C., & Cascio, A. (2021). Rickettsiales in Italy. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020181>
- Hofmann-Lehmann, R., Wagmann, N., Meli, M. L., Riond, B., Novacco, M., Joekel, D., Gentilini, F., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Lloret, A., Carrapiço, T., & Boretti, F. S. (2016). Detection of ‘Candidatus Neohrlichia mikurensis’ and other Anaplasmatataceae and Rickettsiaceae in Canidae in Switzerland and Mediterranean countries. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 158(10), 691–700. <https://doi.org/10.17236/sat00087>
- Huggins, L. G., Colella, V., Atapattu, U., Koehler, A. V., & Traub, R. J. (2022). Nanopore Sequencing Using the Full-Length 16S rRNA Gene for Detection of Blood-Borne Bacteria in Dogs Reveals a Novel Species of Hemotropic Mycoplasma. *Microbiology Spectrum*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03088-22>
- Huggins, L. G., Colella, V., Koehler, A. V., Schunack, B., & Traub, R. J. (2022). A multipronged next-generation sequencing metabarcoding approach unearths hyperdiverse and abundant dog pathogen communities in Cambodia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4), 1933–1950. <https://doi.org/10.1111/tbed.14180>
- Jimenez, I. A., Vega Mariño, P. A., Stapleton, G. S., Prieto, J. B., & Bowman, D. D. (2020). Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100373>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kai, S., Matsuo, Y., Nakagawa, S., Kryukov, K., Matsukawa, S., Tanaka, H., Iwai, T., Imanishi, T., & Hirota, K. (2019). Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*, 9(3), 548–557. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12590>
- Karst, S. M., Ziels, R. M., Kirkegaard, R. H., Sørensen, E. A., McDonald, D., Zhu, Q., Knight, R., & Albertsen, M. (2021). High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nature Methods*, 18(2), 165–169. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01041-y>
- Katherine Bonilla-Aldana, D., Pérez-Doria, A., Pomares-Cantillo, L. H., Beltrán-Sánchez, C. A., Bettin-Martínez, A. C., Campo-Urbina, M. L., & Rodríguez-Morales, A. J. (2020). ORIGINAL ARTICLES Molecular detection of *Anaplasma* spp. in domestic dogs from urban areas of Soledad, Atlántico, Colombia. In *Le Infezioni in Medicina* (Issue 3).
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., & Pfister, K. (2008). Clinical Features of Canine Granulocytic Anaplasmosis in 18 Naturally Infected Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1289–1295. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0180.x>
- Letamendi, J. (2020). *PREVALENCIA DE EHRLICHIA CANIS Y ANAPLASMA PLATYS EN PERROS ATENDIDOS EN LA CLINICA MEDICAL VET*. Universidad Agraria del Ecuador.
- Levy, J. K., Crawford, P. C., Lappin, M. R., Dubovi, E. J., Levy, M. G., Alleman, R., Tucker, S. J., & Clifford, E. L. (2008). Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island,

- Galapagos. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 60–65.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.0034.x>
- Llanes, A., & Rajeev, S. (2020). First Whole Genome Sequence of *Anaplasma platys*, an Obligate Intracellular Rickettsial Pathogen of Dogs. *Pathogens*, 9(4), 277.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9040277>
- Londoño, A. F., Scorpio, D. G., & Dumler, J. S. (2023). Innate immunity in rickettsial infections. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1187267>
- Lu, M., Li, F., Liao, Y., Shen, J. J., Xu, J. M., Chen, Y. Z., Li, J. H., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2019). Epidemiology and Diversity of Rickettsiales Bacteria in Humans and Animals in Jiangsu and Jiangxi provinces, China. *Scientific Reports*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49059-3>
- MacQueen, D., & Centellas, F. (2022). Human Granulocytic Anaplasmosis. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 36, Issue 3, pp. 639–654). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.02.008>
- Martínez Díaz, H.-C., Gil-Mora, J., Betancourt-Ruiz, P., Silva-Ramos, C. R., Matiz-González, J. M., Villalba-Perez, M.-A., Ospina-Pinto, M. C., Ramirez-Hernández, A., Olaya-M, L.-A., Bolaños, E., Cuervo, C., Benavides, E., & Hidalgo, M. (2023). Molecular detection of tick-borne rickettsial pathogens in ticks collected from domestic animals from Cauca, Colombia. *Acta Tropica*, 238, 106773. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106773>
- Mazepa, A. W., Kidd, L. B., Young, K. M., & Trepanier, L. A. (2010). Clinical Presentation of 26 *Anaplasma phagocytophilum*-Seropositive Dogs Residing in an Endemic Area. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(6), 405–412.
<https://doi.org/10.5326/0460405>
- McCown, M. E., Monterroso, V. H., & Cardona, W. (2014). Surveillance for *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Dirofilaria immitis* in Dogs From Three Cities in Colombia. *Journal of Special Operations Medicine : A Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 14(1), 86–90.
<https://doi.org/10.55460/yyt5-90fp>
- Miranda, J., & Mattar, S. (2015). Molecular detection of *Anaplasma* sp. and *Ehrlichia* sp. in ticks collected in domestical animals, Colombia. In *Tropical Biomedicine* (Vol. 32, Issue 4). <http://www.unicordoba.edu.co/index.php/investigacion/inst-investigacion/instituto>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical Microbiology* (9th ed.). Elsevier.
- Oneal, A. J., Singh, N., Mendes, M. T., & Pedra, J. H. F. (2021). The genus *Anaplasma*: Drawing back the curtain on tick-pathogen interactions. In *Pathogens and Disease* (Vol. 79, Issue 5). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab022>
- Otalora, Ó., Couto, G., Benavides, J., Mucha, C., & Morchón, R. (2022). Current distribution of selected canine vector-borne diseases in domestic dogs from Barranquilla and Puerto Colombia, Atlántico, Colombia. *Veterinary Medicine and Science*, 8(1), 46–51.
<https://doi.org/10.1002/vms3.673>
- Patterson, L. N. L., Byerly, C. D., & McBride, J. W. (2021). Anaplasmatataceae: Dichotomous Autophagic Interplay for Infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.642771>
- Pesapane, R., Foley, J., Thomas, R., & Castro, L. R. (2019). Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from northern Colombia. *Veterinary Microbiology*, 233, 184–189.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.002>

- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015). Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
- Poitout, F. M., Shinozaki, J. K., Stockwell, P. J., Holland, C. J., & Shukla, S. K. (2005). Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum* Infecting Dogs in Western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 796–801. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.796-801.2005>
- Ravnik, U., Tozon, N., Smrdel, K. S., & Zupanc, T. A. (2011). Anaplasmosis in dogs: The relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.005>
- Rozas, M., Brillet, F., Callewaert, C., & Paetzold, B. (2022a). MinION™ Nanopore Sequencing of Skin Microbiome 16S and 16S-23S rRNA Gene Amplicons. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.806476>
- Rozas, M., Brillet, F., Callewaert, C., & Paetzold, B. (2022b). MinION™ Nanopore Sequencing of Skin Microbiome 16S and 16S-23S rRNA Gene Amplicons. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.806476>
- Rueda-Concha, K. L., Payares-Mercado, A., Guerra-Castillo, J., Melendrez, J., Arroyo-Munive, Y., Martínez-Abad, L., Cochero, S., Bejarano, E. E., & Paternina, L. E. (2022). Silent circulation of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* among urban dogs from Sincelejo city, Caribbean region of Colombia. *Biomedica*, 42(4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.6369>
- Schön, M. E., Martijn, J., Vosseberg, J., Köstlbacher, S., & Ettema, T. J. G. (2022). The evolutionary origin of host association in the Rickettsiales. *Nature Microbiology*, 7(8), 1189–1199. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01169-x>
- Silaghi, C., Kohn, B., Chirek, A., Thiel, C., Nolte, I., Liebisch, G., & Pfister, K. (2011). Relationship of Molecular and Clinical Findings on *Anaplasma phagocytophilum* Involved in Natural Infections of Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4413–4414. <https://doi.org/10.1128/JCM.06041-11>
- Silva, C. B. da, Santos, H. A., Navarrete, M. G., Ribeiro, C. C. D. U., Gonzalez, B. C., Zaldivar, M. F., Pires, M. S., Peckle, M., Costa, R. L. da, Vitari, G. L. V., & Massard, C. L. (2016). Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.012>
- Snowden, J., Ladd, M., & King, K. C. (2023). *Rickettsial Infection*.
- Thomas, S. (2016). Rickettsiales: Biology, molecular biology, epidemiology, and vaccine development. In *Rickettsiales: Biology, Molecular Biology, Epidemiology, and Vaccine Development*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46859-4>
- Tille, P. (n.d.). *Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology 14th Edition* (14th ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02015-1>
- Uminski, K., Kadkhoda, K., Houston, B. L., Lopez, A., MacKenzie, L. J., Lindsay, R., Walkty, A., Embil, J., & Zarychanski, R. (2018). Anaplasmosis: An emerging tick-borne disease of importance in Canada. *IDCases*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2018.e00472>
- Vargas-Hernandez, G., André, M. R., Cendales, D. M., de Sousa, K. C. M., Gonçalves, L. R., Rondelli, M. C. H., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2016). Detecção molecular de

- espécies de *Anaplasma* em cães na Colômbia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 25(4), 459–464. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016066>
- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
- Vasconcelos, E. J. R., Roy, C., Geiger, J. A., Oney, K. M., Koo, M., Ren, S., Oakley, B. B., & Diniz, P. P. V. P. (2021). Data analysis workflow for the detection of canine vector-borne pathogens using 16 S rRNA Next-Generation Sequencing. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02969-9>
- Vierstraete, A. R., & Braeckman, B. P. (2022). Amplicon_sorter: A tool for reference-free amplicon sorting based on sequence similarity and for building consensus sequences. *Ecology and Evolution*, 12(3). <https://doi.org/10.1002/ece3.8603>
- Vlahakis, P. A., Chitanga, S., Simuunza, M. C., Simulundu, E., Qiu, Y., Changula, K., Chambaro, H. M., Kajihara, M., Nakao, R., Takada, A., & Mweene, A. S. (2018). Molecular detection and characterization of zoonotic *Anaplasma* species in domestic dogs in Lusaka, Zambia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.010>
- Walker, D. H., & Dumler, J. S. (2015). The role of CD8 T lymphocytes in rickettsial infections. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 289–299). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0480-x>
- Wang, J., Dyachenko, V., Munderloh, U. G., & Straubinger, R. K. (2015). Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from endothelial cells to peripheral granulocytes in vitro under shear flow conditions. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(5), 593–603. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0387-0>
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>
- Ybañez, A. P., & Inokuma, H. (2016). *Anaplasma* species of veterinary importance in Japan. In *Veterinary World* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1190–1196). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1190-1196>
- Zambrano, M. (2019). *FACTORES DE RIESGO QUE INCIDEN EN LA PREVALENCIA PUNTUAL DE ANAPLASMOSIS EN PERROS EN UNA ZONA URBANA DEL NORTE DE MANABÍ*. Escuela Superior Politecnica Agropecuaria de Manabi Manuel Félix López.
- Zhao, G. P., Wang, Y. X., Fan, Z. W., Ji, Y., Liu, M. jin, Zhang, W. H., Li, X. Lou, Zhou, S. X., Li, H., Liang, S., Liu, W., Yang, Y., & Fang, L. Q. (2021). Mapping ticks and tick-borne pathogens in China. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21375-1>

ÍNDICE DE ANEXOS

Resultado Secuenciación	34
-------------------------------	----

ANEXO A: CUADRO SECUENCIAS ANAPLASMA PLATYS

Código	Código DNA	Secuencia consenso	Organismo encontrado	Porcentaje de identificación
C6P1	G67	>consensus_barcode06.all_0_0 AGAGGACAATCGGAAGTGAAGTACTTTACGGATTAGCTCAGCCTTGCAGATTGCAACCTATTGAGTACCATTGAGCAGCTGTGAGCCACCCATAAGGGCCGTGCTGACTTGACATATCCCCACCTCTCCAGT TTACCACTGGCAGTCTCCTAAAGTGCCTGGCTAAACCCGCTGGCAACTAAGGATGAGGGTTACGCTGTTGGGGGACTAAACCAACTCTCAGACACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGGAGATCCAGCCGA ACTGCGCCCTCCGTTAAGAAAGGATCTAATCTCAATGCAAGAAAGTGGTAAAGTTCTCCGCTTGATCGAATTAACCAACTGCTCCACCGCTTGCGGGTCCCGCAATTCTTTGAGTTTGTAGCTTGGACCGTATGCTC CCAGGCGGAGTGTAAACGCTTACGACACACAGAGACAAAACGTCACCACTCAGCACTCATCTTTAAGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCTGTTGCTCCCAAGCTTTCGACCTCAGCTCAGTACCGGAC AGATAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCTAATATCTAGAAATTCACCTACACTAGGAATTCGGTATCTCCCGGACTCGAGCTGGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTACCTTTAACTT ACCGAACCGCTACATGCCCCACGCAATAATCCGAACAACGCTTCCCGCTCGTATACCAGGCTGCTGGCAGGAGTTGCGGGGACTTCTGTGGGTACCGTATTATCTCCCACTGAAAGAGTTTAAAC CCTAAGGCTTCTCACTACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCTCCGAGAGTCTGGACGCTATCTCAGTCCAGTGGCTGATCATCTCTCAGACCACTATAGATCA CTGCTTGGTAGGCTTTACCTACCAACTAGCTAATCAATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCACCACTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCTATGCAT TACTCACCCGTGCGCA	Anaplasma platys strain S3	100%
C7P1	G68	>consensus_barcode07.all_0_0(818) AGAGGACAATCGGAAGTGAAGTACTTTACGGATTAGCTCAGCCTTGCAGATTGCAACCTATTGAGTACCATTGAGCAGCTGTGAGCCACCCATAAGGGCCGTGCTGACTTGACATATCCCCACCTCTCCAGT TTACCACTGGCAGTCTCCTAAAGTGCCTGGCTAAACCCGCTGGCAACTAAGGATGAGGGTTACGCTGTTGGGGGACTAAACCAACTCTCAGACACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGGAGATCCAGCCGA ACTGCGCCCTCCGTTAAGAAAGGATCTAATCTCAATGCAAGAAAGTGGTAAAGTTCTCCGCTTGATCGAATTAACCAACTGCTCCACCGCTTGCGGGTCCCGCAATTCTTTGAGTTTGTAGCTTGGACCGTATGCTC CCAGGCGGAGTGTAAACGCTTACGACACACAGAGACAAAACGTCACCACTCAGCACTCATCTTTAAGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCTGTTGCTCCCAAGCTTTCGACCTCAGCTCAGTACCGGAC AGATAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCTAATATCTAGAAATTCACCTACACTAGGAATTCGGTATCTCCCGGACTCGAGCTGGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTACCTTTAACTT ACCGAACCGCTACATGCCCCACGCAATAATCCGAACAACGCTTCCCGCTCGTATACCAGGCTGCTGGCAGGAGTTGCGGGGACTTCTGTGGGTACCGTATTATCTCCCACTGAAAGAGTTTAAAC CCTAAGGCTTCTCACTACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCTCCGAGAGTCTGGACGCTATCTCAGTCCAGTGGCTGATCATCTCTCAGACCACTATAGATCA CTGCTTGGTAGGCTTTACCTACCAACTAGCTAATCAATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCACCACTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCTATGCAT TACTCACCCGTGCGCA	Anaplasma platys strain S3	100%
P3G	G47	>consensus_barcode10.all_0_0(565) TGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTGGATAGCCACTAGAAATGGTGGTAATCTGTATAACTCCGCGGGGAAAGATTTCGCTATTAGTAGGACCTATGTTAGATTAGTATTGGT GGTAAAGGCTCCTAAAGGAGTGTATCTAGCTGTGCTGAGAGGATGATCAGCACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCTCAGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCAGCTAT GCCGCTGAGTGAGGAAAGCCTTAGGGTTGATAAATCTTTCACTGGGAAAGATAATGACGGTACCCACAGAAAGTCCCGGCAACTCCGTCGACAGCCCGGTAATACGAGGGGGCAAGCTGTTTCGGAATTA TTGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGTTCGTAAGTTAAAGGTAAAGTCCAGGGCTTAACTCCGAGCTGCTTTAATCTGCGCAAGCTCAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAATTCGTAGA TATTAGGAGAACCACTGCGCAAGGCGCTATCTGCTCGCTGACTGAGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGTATGAGTGAATGGGGAGCTTTT GTCTCTGTGTTAGTAAACGCTTAAAGCTCCGCTGGGGACTACGGTCCGAAGCTAAACTAAAGGAAATGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGATGCAACGCGAAGAGCTTACCACT TCTGACATGGAGTATGATCTTCTTAAAGGAAAGGGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGATCGCTGTGCTGAGTGTGGTAAAGTCCCGCAAGCGGTAACCTCATCTTCTAGTTTGC CAGCGGTTAAAGCGGCACTTAAAGGAGACTCCAGTGGTAACTGGAGGAGTGGGGATGATGCAAGTCCAGCAGCCCTTATGGGTGGGCTACACAGTGTCAATAGGTGCGCAATGTCG AAGGCTGAGTAACTCGTAAAGTCACTCAGTTCGGATTGCTCT	Anaplasma platys	100%
P18G	G52	>consensus_barcode13.all_0_0(176) AGAGGACAATCGGAAGTGAAGTACTTTACGGATTAGCTCAGCCTTGCAGATTGCAACCTATTGAGTACCATTGAGCAGCTGTGAGCCACCCATAAGGGCCGTGCTGACTTGACATATCCCCACCTCTCCAGT TTACCACTGGCAGTCTCCTAAAGTGCCTGGCTAAACCCGCTGGCAACTAAGGATGAGGGTTACGCTGTTGGGGGACTAAACCAACTCTCAGACACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGGAGATCCAGCCGA ACTGCGCCCTCCGTTAAGAAAGGATCTAATCTCAATGCAAGAAAGTGGTAAAGTTCTCCGCTTGATCGAATTAACCAACTGCTCCACCGCTTGCGGGTCCCGCAATTCTTTGAGTTTGTAGCTTGGACCGTATGCTC CCAGGCGGAGTGTAAACGCTTACGACACACAGAGACAAAACGTCACCACTCAGCACTCATCTTTAAGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCTGTTGCTCCCAAGCTTTCGACCTCAGCTCAGTACCGGAC AGATAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCTAATATCTAGAAATTCACCTACACTAGGAATTCGGTATCTCCCGGACTCGAGCTGGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTACCTTTAACTT ACCGAACCGCTACATGCCCCACGCAATAATCCGAACAACGCTTCCCGCTCGTATACCAGGCTGCTGGCAGGAGTTGCGGGGACTTCTGTGGGTACCGTATTATCTCCCACTGAAAGAGTTTAAAC CCTAAGGCTTCTCACTACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCTCCGAGAGTCTGGACGCTATCTCAGTCCAGTGGCTGATCATCTCTCAGACCACTATAGATCA CTGCTTGGTAGGCTTTACCTACCAACTAGCTAATCAATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCACCACTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCTATGCAT TACTCACCCGTGCGCA	Anaplasma platys strain S3	100%
P16G	G61	>consensus_barcode17.all_0_0(1186) AGAGGACAATCGGAAGTGAAGTACTTTACGGATTAGCTCAGCCTTGCAGATTGCAACCTATTGAGTACCATTGAGCAGCTGTGAGCCACCCATAAGGGCCGTGCTGACTTGACATATCCCCACCTCTCCAGT TTACCACTGGCAGTCTCCTAAAGTGCCTGGCTAAACCCGCTGGCAACTAAGGATGAGGGTTACGCTGTTGGGGGACTAAACCAACTCTCAGACACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGGAGATCCAGCCGA ACTGCGCCCTCCGTTAAGAAAGGATCTAATCTCAATGCAAGAAAGTGGTAAAGTTCTCCGCTTGATCGAATTAACCAACTGCTCCACCGCTTGCGGGTCCCGCAATTCTTTGAGTTTGTAGCTTGGACCGTATGCTC CCAGGCGGAGTGTAAACGCTTACGACACACAGAGACAAAACGTCACCACTCAGCACTCATCTTTAAGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCTGTTGCTCCCAAGCTTTCGACCTCAGCTCAGTACCGGAC AGATAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCTAATATCTAGAAATTCACCTACACTAGGAATTCGGTATCTCCCGGACTCGAGCTGGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTACCTTTAACTT ACCGAACCGCTACATGCCCCACGCAATAATCCGAACAACGCTTCCCGCTCGTATACCAGGCTGCTGGCAGGAGTTGCGGGGACTTCTGTGGGTACCGTATTATCTCCCACTGAAAGAGTTTAAAC CCTAAGGCTTCTCACTACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCTCCGAGAGTCTGGACGCTATCTCAGTCCAGTGGCTGATCATCTCTCAGACCACTATAGATCA CTGCTTGGTAGGCTTTACCTACCAACTAGCTAATCAATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCACCACTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCTATGCAT TACTCACCCGTGCGCA	Anaplasma platys strain S3	100%
P3G	G70	>consensus_barcode18.all_0_0(1301) AGAGGACAATCGGAAGTGAAGTACTTTACGGATTAGCTCAGCCTTGCAGATTGCAACCTATTGAGTACCATTGAGCAGCTGTGAGCCACCCATAAGGGCCGTGCTGACTTGACATATCCCCACCTCTCCAGT TTACCACTGGCAGTCTCCTAAAGTGCCTGGCTAAACCCGCTGGCAACTAAGGATGAGGGTTACGCTGTTGGGGGACTAAACCAACTCTCAGACACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGGAGATCCAGCCGA ACTGCGCCCTCCGTTAAGAAAGGATCTAATCTCAATGCAAGAAAGTGGTAAAGTTCTCCGCTTGATCGAATTAACCAACTGCTCCACCGCTTGCGGGTCCCGCAATTCTTTGAGTTTGTAGCTTGGACCGTATGCTC CCAGGCGGAGTGTAAACGCTTACGACACACAGAGACAAAACGTCACCACTCAGCACTCATCTTTAAGCGTGGACTACCAAGGATCTAATCTGTTGCTCCCAAGCTTTCGACCTCAGCTCAGTACCGGAC AGATAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCTAATATCTAGAAATTCACCTACACTAGGAATTCGGTATCTCCCGGACTCGAGCTGGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGCATTACCTTTAACTT ACCGAACCGCTACATGCCCCACGCAATAATCCGAACAACGCTTCCCGCTCGTATACCAGGCTGCTGGCAGGAGTTGCGGGGACTTCTGTGGGTACCGTATTATCTCCCACTGAAAGAGTTTAAAC CCTAAGGCTTCTCACTACGCGCATAGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCTCCGAGAGTCTGGACGCTATCTCAGTCCAGTGGCTGATCATCTCTCAGACCACTATAGATCA CTGCTTGGTAGGCTTTACCTACCAACTAGCTAATCAATAGGCTCATCTAATAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCACCACTTCTAGTGGCTATCCATACTACTAGGTAGATTCTATGCAT TACTCACCCGTGCGCA	Anaplasma platys strain S3	100%