



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de
Grado

Detección de micoplasmas hemotrópicos en perros con sospecha de hemopatógenos de Galicia: factores de riesgo y efecto en el hematocrito.

Xiana Pérez García

Grado en Veterinaria

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Xiana Pérez García y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional.

Detección de micoplasmas hemotrópicos en perros con sospecha de hemopatógenos de Galicia: factores de riesgo y efecto en el hematocrito. © 2024 by Xiana Pérez García is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



RESUMEN

Los micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) son bacterias epicelulares obligadas que infectan los glóbulos rojos de una amplia variedad de mamíferos, pudiendo causar anemia hemolítica de gravedad variable. En el perro se describen dos especies: *Mycoplasma haemocanis* y “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”. En ellos, la infección suele tener un curso crónico asintomático, pero la esplenectomía y la inmunosupresión favorecen el desarrollo de una infección aguda manifiesta.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la presencia de micoplasmas hemotrópicos en perros con sospecha clínica de infección por hemopatógenos, identificar las especies detectadas molecularmente y determinar si ciertos factores influyen en la presencia de estos patógenos. Además, se evaluó el efecto de los micoplasmas hemotrópicos sobre el valor del hematocrito en infecciones únicas y en coinfección con *Babesia* spp.

Para ello se analizaron 60 extracciones de ADN obtenidas de muestras de sangre de perros de Galicia con sospecha clínica de infección por hemopatógenos mediante PCR convencional para la detección de hemoplasmas. Posteriormente, las muestras positivas se secuenciaron y se estudió su variabilidad genética mediante la construcción de un árbol filogenético. A continuación, con los datos recogidos de cada animal (edad, sexo, aptitud, infección por *Babesia* spp., hematocrito), se realizó un análisis estadístico para valorar los posibles factores de riesgo y el efecto de la infección sobre el hematocrito en infecciones únicas o mixtas con *Babesia* spp.

Un total de 14 muestras (23,3%) resultaron positivas, y las especies encontradas fueron: “*Ca. M. haematoparvum*” (20%) y *M. haemocanis* (3%). El análisis estadístico no mostró una asociación significativa entre la edad, el sexo y la coinfección con *Babesia* spp. respecto a la positividad por hemoplasmas; sin embargo, la aptitud de caza se asoció significativamente con una mayor tasa de infección. Además, se determinó que los micoplasmas hemotrópicos, solos o en coinfección con *Babesia* spp., no muestran un efecto significativo sobre el valor del hematocrito.

Este trabajo representa el primer estudio molecular de la ocurrencia de estas infecciones en perros de Galicia, y en él se detectaron las dos especies de micoplasmas hemotrópicos consideradas propias de la especie canina. Además, el análisis estadístico refuerza la idea de que la transmisión de estos patógenos se produce a través de vectores, ya que los perros de hábitat rural, como los de caza, presentaron una mayor tasa de infección. Sin embargo, los micoplasmas hemotrópicos no parecen tener una gran capacidad patógena, ya que su presencia no se asoció con un menor valor de hematocrito, tanto en infecciones únicas como en coinfecciones con *Babesia* spp.

Palabras clave: micoplasmas hemotrópicos, perros, PCR, factores de riesgo, hematocrito, coinfección.

RESUMO

Os micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) son bacterias epicelulares obrigadas que infectan os glóbulos vermellos dunha ampla variedade de mamíferos, podendo causar anemia hemolítica de gravidade variable. No can descríbense dúas especies: *Mycoplasma haemocanis* e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”. Neles, a infección adoita ter un curso crónico asintomático, pero a esplenectomía e a inmunosupresión favorecen o desenvolvemento dunha infección aguda manifesta.

Os obxectivos deste traballo foron determinar a presenza de micoplasmas hemotrópicos en cans con sospeita clínica de infección por hemopatóxenos, identificar as especies detectadas molecularmente e determinar se certos factores inflúen na presenza destes patóxenos. Ademais, avalíouse o efecto dos micoplasmas hemotrópicos sobre o valor do hematocrito en infeccións únicas e en coinfección con *Babesia* spp.

Para iso analizáronse 60 extraccións de ADN obtidas de mostras de sangue de cans de Galicia con sospeita clínica de infección por hemopatóxenos mediante PCR convencional para a detección de hemoplasmas. Posteriormente, as mostras positivas secuenciáronse e estudouse a súa variabilidade xenética mediante a construción dunha árbore filoxenética. A continuación, cos datos recollidos de cada animal (idade, sexo, aptitude, infección por *Babesia* spp., hematocrito), realizouse unha análise estatística para valorar os posibles factores de risco e o efecto da infección sobre o hematocrito en infeccións únicas ou mixtas con *Babesia* spp.

Un total de 14 mostras (23,3%) resultaron positivas, e as especies atopadas foron: “*Ca. M. haematoparvum*” (20%) e *M. haemocanis* (3%). A análise estatística non mostrou unha asociación significativa entre a idade, o sexo e a coinfección con *Babesia* spp. respecto á positividade por hemoplasmas; con todo, a aptitude de caza asociouse significativamente cunha maior taxa de infección. Ademais, determinouse que os micoplasmas hemotrópicos, sós ou en coinfección con *Babesia* spp., non mostran un efecto significativo sobre o valor do hematocrito.

Este traballo representa o primeiro estudo molecular da ocorrencia destas infeccións en cans de Galicia, e nel detectáronse as dúas especies de micoplasmas hemotrópicos consideradas propias da especie canina. Ademais, a análise estatística reforza a idea de que a transmisión destes patóxenos prodúcese a través de vectores, xa que os cans de hábitat rural, como os de caza, presentaron unha maior taxa de infección. Con todo, os micoplasmas hemotrópicos non parecen ter unha gran capacidade patóxena, xa que a súa presenza non se asociou cun menor valor de hematocrito, tanto en infeccións únicas como en coinfeccións con *Babesia* spp.

Palabras chave: micoplasmas hemotrópicos, cans, PCR, factores de risco, hematocrito, coinfección.

ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are obligate epicellular bacteria that infect the red blood cells of a wide variety of mammals, potentially causing hemolytic anemia of varying severity. In dogs, two species are described: *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*.” In these animals, the infection usually has a chronic asymptomatic course, but splenectomy and immunosuppression favor the development of an acute manifest infection.

The objectives of this study were to determine the presence of hemotropic mycoplasmas in dogs with clinical suspicion of hemopathogen infection, identify the molecularly detected species, and determine if certain factors influence the presence of these pathogens. Additionally, the effect of hemotropic mycoplasmas on hematocrit levels was evaluated in single infections and coinfections with *Babesia* spp.

To this end, 60 DNA extractions obtained from blood samples of dogs from Galicia with clinical suspicion of hemopathogen infection were analyzed using conventional PCR for the detection of hemoplasmas. Subsequently, positive samples were sequenced, and their genetic variability was studied by constructing a phylogenetic tree. Then, with the data collected from each animal (age, sex, aptitude, infection with *Babesia* spp., hematocrit), a statistical analysis was performed to assess possible risk factors and the effect of the infection on hematocrit in single or mixed infections with *Babesia* spp.

A total of 14 samples (23.3%) tested positive, and the species found were: “*Ca. M. haematoparvum*” (20%) and *M. haemocanis* (3%). Statistical analysis did not show a significant association between age, sex, and coinfection with *Babesia* spp. concerning hemoplasma positivity; however, hunting aptitude was significantly associated with a higher infection rate. Furthermore, it was determined that hemotropic mycoplasmas, alone or in coinfection with *Babesia* spp., do not show a significant effect on hematocrit levels.

This study represents the first molecular investigation of the occurrence of these infections in dogs from Galicia, detecting the two species of hemotropic mycoplasmas considered characteristic of the canine species. Additionally, the statistical analysis reinforces the idea that the transmission of these pathogens occurs through vectors, as rural habitat dogs, such as hunting dogs, showed a higher infection rate. However, hemotropic mycoplasmas do not seem to have a high pathogenic capacity, as their presence was not associated with lower hematocrit levels, both in single infections and coinfections with *Babesia* spp.

Keywords: hemotropic mycoplasmas, dogs, PCR, risk factors, hematocrit, coinfection.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	8
1.1	Etiología	8
1.2	Epidemiología	9
1.2.1	Distribución geográfica	9
1.2.2	Hospedadores	10
1.2.3	Transmisión	11
1.2.4	Factores de riesgo	12
1.3	Patogenia	14
1.4	Signos clínicos.....	15
1.5	Diagnóstico.....	15
1.5.1	Hemograma y bioquímica	15
1.5.2	Examen citológico.....	16
1.5.3	PCR	17
1.6	Tratamiento	17
1.7	Prevención y control	18
2.	OBJETIVOS	19
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1	Origen y características de las muestras incluidas.....	20
3.2	Análisis de laboratorio.....	21
3.2.1	PCR convencional	21
3.2.2	Secuenciación del ADN	23
3.3	Análisis filogenético	24
3.3.1	Identificación de las especies de micoplasmas hemotrópicos	24
3.3.2	Alineamiento y construcción del árbol filogenético.....	24
3.4	Análisis estadístico	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1	Características de la población muestreada	27
4.2	Presencia de micoplasmas hemotrópicos	27
4.3	Especies de micoplasmas hemotrópicos y análisis filogenético.....	29
4.4	Características de la población positiva a micoplasmas hemotrópicos y análisis de los factores de riesgo asociados	31
4.5	Efecto de los micoplasmas hemotrópicos sobre el hematocrito y análisis del efecto de la coinfección con <i>Babesia</i> spp.	35
5.	CONCLUSIONES	38
6.	BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIC: *Akaike Information Criterion*.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

Ca.: "*Candidatus*".

CMhp: "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*".

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EE.UU.: Estados Unidos.

F: *forward*.

HCT: hematocrito.

INVESAGA: Investigación en Sanidade Animal de Galicia.

Mhc: *Mycoplasma haemocanis*.

Mhf: *Mycoplasma haemofelis*.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

pb: par de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: PCR en tiempo real.

R: *reverse*.

rpm: revoluciones por minuto.

TAE: Tris, acetato y EDTA.

TR + I + G: *General Time Reversible + Invariant sites + Gamma-distributed*.

UI: unidades internacionales.

1. INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas hemotrópicos, comúnmente conocidos como hemoplasmas, son un grupo de bacterias gramnegativas de pequeño tamaño, no cultivables y sin pared celular que infectan los glóbulos rojos de una amplia variedad de mamíferos, pudiendo causar en ellos una anemia hemolítica de gravedad variable (Barker y Tasker, 2022).

Las principales especies que infectan a los animales de compañía son *Mycoplasma haemocanis* y “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” en el perro, y *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” y “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” en el gato. En esta especie, *M. haemofelis* se considera el agente causal de la anemia infecciosa felina (Sykes y Tasker, 2014), mientras que la mayoría de perros infectados por hemoplasmas presentan infecciones crónicas asintomáticas (Willi *et al.*, 2010).

1.1 Etiología

Los micoplasmas hemotrópicos fueron descritos por primera vez en 1921 por M. Mayer, quien propuso el término *Bartonella muris* para referirse a los cuerpos de inclusión observados en los glóbulos rojos de una rata de laboratorio afectada por anemia severa (Mayer, 1921; revisado por Neitz, 1938). Años más tarde, W. Kikuth (1928) identificó un patógeno similar en un perro esplenectomizado, que denominó *Bartonella canis*, y R. Clark (1942) designó como *Eperythrozoon felis* al patógeno causante de un cuadro anémico fulminante en un gato.

Originalmente, los hemoplasmas fueron clasificados dentro de los géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* (orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*) debido a su tropismo eritrocitario, pequeño tamaño y presunta transmisión por artrópodos (Kreier y Ristic, 1984, revisado por Willi *et al.*, 2007). Sin embargo, análisis filogenéticos posteriores basados en la secuenciación del gen que codifica el ARN ribosomal 16 S (ARNr 16S) revelaron que, en realidad, estos organismos estaban más estrechamente relacionados con los micoplasmas, con los que compartían características fenotípicas como su pequeño tamaño, la ausencia de pared celular y los exigentes requisitos de crecimiento (Neimark y Kocan, 1997; Rikihisa *et al.*, 1997). Esto condujo a su reclasificación dentro del género *Mycoplasma* (orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*) (Neimark *et al.*, 2001). Sin embargo, este género se caracterizaba por albergar especies bacterianas como *M. pneumoniae* o *M. genitalium*, que colonizan epitelios mucosos, presentando un tropismo muy diferente en comparación con los hemoplasmas (Barker y Tasker, 2022). Un estudio filogenético posterior basado en los genes *gapA* y *dnaK* sugirió que, aunque los hemoplasmas pertenecen a la familia *Mycoplasmataceae*, estos deberían conformar un género separado (Hicks *et al.*, 2014).

Debido a sus exigentes características de crecimiento, los micoplasmas hemotrópicos no pueden ser cultivados *in vitro*. Esto limita su caracterización fenotípica completa, lo que hace necesario que el prefijo "*Candidatus*" se aplique a los hemoplasmas recién descritos hasta que se disponga de más información que respalde su clasificación (Neimark *et al.*; 2001, 2002).

En el caso del perro, objeto de este trabajo, se han descrito principalmente dos especies de hemoplasmas: *Mycoplasma haemocanis* (*Mhc*) y "*Ca. M. haematoparvum*" (*CMhp*) (Kikuth, 1928; Sykes *et al.*, 2005). De manera análoga a lo descrito para otros hemoplasmas, se trata de organismos gramnegativos, sin pared celular y pleomórficos. Estos patógenos son epieritrocitarios obligados y se encuentran adheridos a la superficie del eritrocito, donde pueden encontrarse individualmente o agrupados en cadenas (Messick, 2004).

Mhc es un hemoplasma relativamente grande, con un diámetro de 0,3 a 2 μm , y se caracteriza por agruparse formando largas cadenas de organismos en la superficie de los eritrocitos, aunque también puede aparecer individualmente (Messick *et al.*, 2002; Venable y Ewing, 1968). Presenta grandes similitudes genéticas respecto a *M. haemofelis* (*Mhf*), habiéndose hipotetizado que fuesen una misma especie (Brinson y Messick, 2001), pero estudios posteriores basados en el análisis de secuencias genéticas parciales y del genoma completo permitieron diferenciarlos como especies distintas (Birkenheuer *et al.*, 2002; Do Nascimento *et al.*, 2012).

Por otra parte, *CMhp* se asemeja a "*Ca. M. haemominutum*" tanto morfológica como genéticamente, presentando un tamaño uniformemente pequeño de aproximadamente 0,3 μm de diámetro y no agrupándose en cadenas. De manera similar a lo descrito para *Mhc* y *Mhf*, a pesar de sus similitudes, los análisis filogenéticos permitieron distinguirlas como especies distintas (Sykes *et al.*, 2005).

1.2 Epidemiología

1.2.1 Distribución geográfica

Los micoplasmas hemotrópicos, incluyendo *M. haemocanis* y "*Ca. M. haematoparvum*", presentan distribución mundial, habiéndose descrito casos en todos los continentes. De forma general, *M. haemocanis* es la especie más prevalente (Barker y Tasker, 2016).

En los diferentes estudios epidemiológicos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la prevalencia notificada para la hemoplasmosis canina varía ampliamente, con rangos que oscilan entre el 1,2% (Wengi *et al.*, 2008) y el 56,7 % (Beus *et al.*, 2024). Esta variabilidad podría atribuirse a distintos factores, como la diferente climatología de las áreas estudiadas, las características de la población muestreada (estado clínico, aptitud o exposición a ectoparásitos) y las diferencias en la sensibilidad diagnóstica de los ensayos de PCR utilizados (Aquino *et al.*,

2016; Novacco *et al.*, 2010). En relación con esto, se ha sugerido que la marcada variación geográfica puede responder a la mayor o menor presencia del vector propuesto como transmisor de los hemoplasmas caninos, *Rhipicephalus sanguineus* (Seneviratna *et al.*, 1973); así, la prevalencia demostró ser superior en países con climas que favorecen la existencia de este vector (Wengi *et al.*, 2008). Respecto a nuestro país, los escasos estudios realizados señalan también prevalencias variables, que se sitúan entre el 2,5 - 14,3 % (Novacco *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2010).

1.2.2 Hospedadores

Tradicionalmente, se ha considerado que los hemoplasmas son específicos de hospedador (do Nascimento *et al.*, 2012). Sin embargo, diversos trabajos han demostrado que pueden ser detectados en diferentes especies de hospedadores. De esta manera, además de *M. haemocanis* y “*Ca. M. haematoparvum*”, otras cuatro especies de hemoplasmas que usualmente infectan a otros animales también han sido detectadas en la especie canina (Tabla 1). Así, “*Ca. M. haemominutum*”, que infectan fundamentalmente a los gatos, se encontró en muestras de sangre de perros en Japón y China (Obara *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2009), y “*Ca. M. turicensis*”, también propio de la especie felina, se encontró en Chile (Soto *et al.*, 2017). En EE.UU., *M. ovis*, común en cabras y ovejas, se detectó en muestras de perros con hemangiosarcoma esplénico (Varanat *et al.*, 2011), y en Australia, “*Ca. M. haemobos*”, que infecta mayoritariamente al ganado vacuno, se detectó en dos muestras de sangre de la especie canina (Hii *et al.*, 2012, 2015). No obstante, la importancia clínica de estas especies de hemoplasmas en perros aún no está clara (Sykes y Tasker, 2014).

Tabla 1. Principales especies de micoplasmas hemotrópicos de importancia veterinaria. Elaborado a partir de Quiroz-Castañeda *et al.* (2020).

Hospedador principal	Especie de micoplasma hemotrópico
Perro	<i>Mycoplasma haemocanis</i>
	Candidatus <i>Mycoplasma haematoparvum</i>
Gato	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
	Candidatus <i>Mycoplasma haemominutum</i>
	Candidatus <i>Mycoplasma turicensis</i>
Vacuno	<i>Mycoplasma wenyonii</i>
	Candidatus <i>Mycoplasma haemobos</i>
Ovino y Caprino	<i>Mycoplasma ovis</i>
	Candidatus <i>Mycoplasma haemovis</i>
Porcino	<i>Mycoplasma suis</i>
	<i>Mycoplasma parvum</i>

1.2.3 Transmisión

El mecanismo de transmisión de los micoplasmas hemotrópicos en perros no está completamente esclarecido, y se especula con que existen diferentes vías implicadas (Barker y Tasker, 2022).

- **Transmisión mediante vectores artrópodos.** La garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, fue propuesta por Seneviratna *et al.* (1973) como un vector significativo para la transmisión de *M. haemocanis*. Esta hipótesis fue respaldada por estudios epidemiológicos posteriores, en los que se observó una fuerte correlación entre la presencia de *R. sanguineus* y la incidencia de infecciones por hemoplasma (Inokuma *et al.*, 2006; Novacco *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008). Sin embargo, solamente uno de los diversos estudios moleculares realizados para demostrar la presencia de hemoplasmas caninos en estas garrapatas ha tenido éxito, a excepción de uno de ellos (Do *et al.*, 2021). Esta observación, unida a que no parece existir transmisión transtadial de estos patógenos en condiciones de campo en esta especie (Aktas y Ozubek, 2017), sugiere que es poco probable que *R. sanguineus* actúe como vector biológico, aunque esto no descarta que tenga un papel como vector mecánico. Por otra parte, un estudio en Corea del Sur (Guk-Hyun *et al.*, 2017) demostró una alta prevalencia de hemoplasmosis canina en un área con baja presencia de *R. sanguineus*, sugiriendo la posible implicación de otras especies de garrapatas en la transmisión de estos patógenos.

Las pulgas también podrían actuar como vectores en los perros, tal y como ocurre en el gato (Woods *et al.*, 2005). La especie de pulgas más comúnmente encontrada en perros y gatos, tanto en Europa como en otras regiones del mundo, es *Ctenocephalides felis* (Gálvez *et al.*, 2017), y esta pulga ha sido confirmada como vector transmisor de los hemoplasmas felinos (Woods *et al.*, 2005), por lo que podría estar contribuyendo igualmente a la transmisión en el perro. En este sentido, Soares *et al.* (2016) encontraron que tres de cuatro perros infectados con *M. haemocanis* tenían antecedentes de infestación por pulgas, y Beus *et al.* (2024) asociaron la infestación por pulgas como un factor de riesgo para la infección por hemoplasmas en perros, encontrando además ADN de estos microorganismos en las especies *Pulex irritans* y *Ctenocephalides canis* (Beus *et al.*, 2024). Por último, cabe mencionar que Novacco *et al.* (2010) demostraron una asociación entre la infestación por sarna y la hemoplasmosis canina, por lo que se sugirió que los ácaros también podrían desempeñar un papel en la transmisión mecánica de estos patógenos. Sin embargo, esta asociación también podría explicarse por un sistema inmunitario menos eficiente en los animales infestados (Duclos *et al.*, 1994).

- **Transmisión vertical.** Este modo de transmisión no ha sido probado experimentalmente, pero se sugirió tras comprobarse en un estudio que parte de la descendencia de una perra infectada por *M. haemocanis* también era positiva a este patógeno, aunque la posibilidad de transmisión

perinatal no se pudo descartar (Lashnits *et al.*, 2019). Con todo, es razonable sospechar la transmisión vertical de los micoplasmas hemotrópicos, dado que es un modo de transmisión importante para otros patógenos que infectan los glóbulos rojos de los perros, como *Babesia canis* y *Babesia gibsoni* (Mierzejewska *et al.*, 2014).

- **Transmisión por mordeduras o interacciones agresivas.** Este modo de transmisión fue inicialmente sugerido por Sasaki *et al.* (2008), quienes notificaron una mayor prevalencia de infección por hemoplasmas en perros de pelea en Japón, y fue posteriormente respaldado por Cannon *et al.* (2016) durante una investigación en perros de pelea en Estados Unidos. Además, Huggings *et al.* (2023) relacionaron el aumento en las infecciones por hemoplasmas con las interacciones agresivas entre perros de una población cerrada sometida a tratamiento ectoparasiticida. Esta vía de transmisión también fue apoyada por Barker *et al.* (2010), quienes encontraron una mayor prevalencia de hemoplasmas en perros machos rurales de Tanzania que deambulaban libremente y se involucraban en peleas, y por de Faria Valle *et al.* (2014), quienes vincularon la presencia de heridas de mordedura en los perros con una mayor prevalencia de micoplasmas hemotrópicos.
- **Transmisión iatrogénica.** Los hemoplasmas caninos pueden ser transmitidos mediante la administración parenteral de sangre infectada. Así, se han documentado casos de infecciones por hemoplasmas caninos asociadas a transfusiones sanguíneas (Kim *et al.*, 2020; Lester *et al.*, 1995; Nury *et al.*, 2021), y en algunos estudios experimentales se empleó la inyección intravenosa de sangre infectada para inocular el patógeno a animales sanos (Pyor y Bradbury, 1975; Wright, 1971). Además, en un estudio que analizó concentrados de hematíes caninos almacenados a 4° C en solución de citrato fosfato dextrosa adenina (CPDA-1), se demostró mediante PCR la presencia de ADN de *M. haemocanis* durante un periodo de 29 días, y se observó un aumento gradual en su concentración durante este periodo. En este mismo trabajo, también se detectaron alteraciones metabólicas en dichos concentrados, incluyendo una rápida depleción de glucosa y un aumento en los niveles de lactato, lo que sugiere la viabilidad y, por ende, la transmisibilidad del patógeno mediante esta vía (Camargo Castillo *et al.*, 2023).

1.2.4 Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados a la infección por micoplasmas hemotrópicos en el perro son numerosos y varían entre los estudios realizados. Algunos autores sostienen que esta variabilidad podría estar relacionada con la existencia de factores de confusión o asociaciones débiles entre estos y las prevalencias detectadas (Ravagnan *et al.*, 2017), si bien podría ser también el reflejo de las diferencias en cuanto a la población estudiada (animales sanos vs. animales con sintomatología) o el estilo de vida de los animales (ambiente rural vs. áreas urbanas) (da Costa Vieira *et al.*, 2015).

El factor de riesgo más constante en los diferentes estudios es aquel relacionado con el estilo de vida de los animales. Los perros procedentes de colectivos como **protectoras y criaderos**, así como aquellos **asilvestrados o vagabundos**, presentan un mayor riesgo de contraer infecciones por hemoplasmas. Esto se ha atribuido a la mayor densidad de animales y a una mayor exposición a vectores artrópodos en estos grupos, que podría aumentar la tasa de transmisión de hemoplasmas entre perros. También se ha atribuido a una mayor posibilidad de transmisión mediante interacciones agresivas (Aktas y Ozubek, 2018; de Faria Valle *et al.*, 2014; Kemming *et al.*, 2004a; Novacco *et al.*, 2010; Ravagnan *et al.*, 2017).

Por otra parte, diversas investigaciones han relacionado la **presencia de garrapatas** en perros con una mayor tasa de infección por micoplasmas hemotrópicos, con Odds Ratio que oscilan entre 3,7 – 4,4 (Aktas y Ozubek, 2018; de Faria Valle *et al.*, 2014; Happi *et al.*, 2018), lo cual se explica por su papel como vector transmisor. Sin embargo, otros estudios no han podido establecer esta relación (Aquino *et al.*, 2016; Barker *et al.*, 2010).

Respecto al sexo y edad, los resultados varían ampliamente entre las diferentes investigaciones. Algunos estudios han demostrado que los perros **machos** tienen una mayor probabilidad de ser positivos a hemoplasmas (Barker *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2016), lo cual se asoció al mayor riesgo de contagio durante el contacto agresivo, más frecuente en este sexo (Aktas y Ozubek, 2017). Por otra parte, los perros de **mayor edad** también mostraron una mayor positividad a micoplasmas hemotrópicos, explicada por una mayor exposición al patógeno a lo largo de su vida o por un curso crónico de la infección (Aktas y Ozubek, 2018; Soto *et al.*, 2017). No obstante, otros estudios no encontraron ninguna asociación entre el sexo y la edad respecto a la infección por hemoplasmas (Aktas y Ozubek, 2017; Happi *et al.*, 2018; Novacco *et al.*, 2010; Ravagnan *et al.*, 2017; Roura *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008).

En relación con la raza, Novacco *et al.* (2010) señalaron que los animales **mestizos** tenían un mayor riesgo de presentar una infección por hemoplasmas; sin embargo, la mayoría de los perros mestizos de este estudio procedían de diferentes colectivos caninos, con lo que la variable “raza” podría actuar como un factor de confusión. Por otra parte, Cannon *et al.* (2016) establecieron que las razas de perros utilizadas ilegalmente en peleas presentaban un mayor riesgo de infección por micoplasmas hemotrópicos. No obstante, dado que la mayoría de los perros usados en estas actividades son machos, de mayor tamaño y más agresivos, es posible que exista también cierto efecto confusor entre estas variables.

La **coinfeción con otros patógenos o patologías** también se ha relacionado con una mayor probabilidad de infección por hemoplasmas. Así, la coinfección con otros hemopatógenos transmitidos por vectores, como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp., se ha señalado como un posible factor de riesgo para la infección por hemoplasmas en perros (Aktas y Ozubek, 2018; Cannon *et*

al., 2016; Hii *et al.*, 2012; Roura *et al.*, 2010). De manera similar, la infestación por ácaros de la sarna (Novacco *et al.*, 2010) y las enfermedades neoplásicas (de Faria Valle *et al.*, 2014) parecen tener también cierta relación con la aparición de micoplasmosis hemotrópica en esta especie, lo que parece sugerir que el estado general del sistema inmune es relevante para el padecimiento de esta infección.

1.3 Patogenia

El mecanismo responsable del daño inducido por los micoplasmas hemotrópicos en los eritrocitos aún no ha sido completamente esclarecido para las especies que afectan al perro (Pitorri *et al.*, 2012). Hasta donde se conoce en estas y otras especies de hemoplasmas, estos microorganismos se adhieren a la superficie de los glóbulos rojos del hospedador y se multiplican por fisión binaria a expensas de los nutrientes proporcionados por la célula hospedadora, entre los que se incluyen fosfolípidos y colesterol de la membrana del eritrocito (Messik, 2004). Este proceso genera daños directos en la membrana eritrocitaria, alterando su morfología y reduciendo su capacidad de deformación. Estos cambios favorecen la fragilidad de los glóbulos rojos, lo que puede interferir en la perfusión tisular y la liberación de oxígeno a nivel microcirculatorio (Barker y Tasker, 2016; Kemming *et al.*, 2004b; Venable *et al.*, 1968). Además, la adhesión del patógeno a los eritrocitos parece dar lugar a la exposición de ciertos antígenos eritrocitarios, desencadenando así una reacción inmunomediada por parte del hospedador, con la consiguiente producción de anticuerpos y destrucción de los eritrocitos infectados (Harvey, 2008; Zobba *et al.*, 2020).

En general, cuando la infección ocurre en un animal inmunocompetente y no esplenectomizado, los glóbulos rojos infectados son secuestrados y fagocitados por los macrófagos del bazo, resultando en una disminución del nivel de infección. Así, estos animales típicamente desarrollarán una infección sin signos clínicos evidentes (Maede, 1979, revisado por Neimark *et al.*, 2001). En cambio, en un animal esplenectomizado (Hulme-Moir *et al.*, 2010; Kemming *et al.*, 2004b; Lapsina *et al.*, 2023; Lester *et al.*, 1995; Pitorri *et al.*, 2012; Zobba *et al.*, 2020) o inmunodeprimido (Gretillat 1981; Kim *et al.*, 2020) los eritrocitos infectados no son captados por los macrófagos, sino que permanecen en la circulación, favoreciendo el desarrollo de una infección aguda manifiesta (Neimark *et al.*, 2001). Asimismo, cuando un paciente con una infección crónica asintomática se somete a la extirpación del bazo, a menudo esto resulta en la aparición de un gran número de eritrocitos infectados en la circulación y el desarrollo de una anemia hemolítica aguda; cuando esto sucede, los síntomas pueden aparecer rápidamente (1–2 semanas) o de manera más gradual (4–9 semanas) (Brinson y Messick, 2001; Kemming *et al.*, 2004b; Lapsina *et al.*, 2023).

En resumen, la hemólisis que se produce en una infección por micoplasmas hemotrópicos se atribuye a los efectos de la adhesión, a la fagocitosis de los eritrocitos parasitados por parte del

sistema reticuloendotelial (hemólisis extravascular) y a la destrucción inmunomediada de los mismos (hemólisis intravascular), aunque esta última se considera poco frecuente en la especie canina (Barker y Tasker, 2016; Warman *et al.*, 2010).

1.4 Signos clínicos

Tal y como se ha explicado anteriormente, el curso clínico de la hemoplasmosis canina varía desde la infección crónica asintomática hasta la infección aguda con sintomatología manifiesta. Lo más habitual es que en el perro las infecciones cursen de manera subclínica, y que sólo desarrollen signos clínicos aquellos que presentan un historial de esplenectomía, infecciones concurrentes o inmunosupresión (Messick, 2004; Sykes *et al.*, 2005). Sin embargo, también se han reportado casos de hemoplasmosis con sintomatología clínica en perros inmunocompetentes y con el bazo intacto (García Luccioni y Rodríguez López, 2018; North, 1978; Sharifiyazdi *et al.*, 2014).

Los signos clínicos asociados a la hemoplasmosis aparecen como resultado del cuadro anémico asociado e incluyen principalmente letargia, inapetencia y palidez de mucosas, así como fiebre intermitente, pérdida de peso y deshidratación. En animales con anemia severa, también puede aparecer taquicardia, taquipnea y pulso débil, siendo infrecuente el desarrollo de ictericia (Barker y Tasker, 2022).

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Hemograma y bioquímica

En la mayoría de casos, los perros con infección crónica suelen presentar valores de hemograma dentro de los límites de referencia. Sin embargo, cuando aparece sintomatología clínica, típicamente se observa una anemia regenerativa de moderada a severa. Ocasionalmente, la anemia puede no ser regenerativa si no ha transcurrido suficiente tiempo desde la infección para que la médula ósea desarrolle una respuesta, o como resultado de una enfermedad concomitante. En cuanto a los leucocitos, no se observan hallazgos característicos: el recuento de neutrófilos puede ser normal, elevado o bajo, y en ocasiones se observa linfopenia. Respecto al recuento plaquetario, es frecuente encontrar trombocitopenia, aunque los valores pueden encontrarse dentro del intervalo de referencia (Sykes y Tasker, 2014).

En la mayoría de pacientes los hallazgos del perfil bioquímico no son significativos, aunque en algunos casos se ha descrito un incremento de las enzimas hepatocelulares como resultado del daño hipóxico al tejido hepático, así como hiperbilirrubinemia secundaria a la hemólisis y azotemia prerrenal asociada a la deshidratación (Barker y Tasker, 2016).

1.5.2 Examen citológico

La identificación de micoplasmas hemotrópicos mediante microscopía óptica en frotis sanguíneos es posible, pero presenta una sensibilidad baja (0-37%), ya que para lograr su visualización es necesario que estén presentes en sangre una gran cantidad de microorganismos. Su especificidad también es limitada, ya que es necesario distinguir los hemoplasmas de posibles precipitados de tinción, artefactos de desecación y pequeños cuerpos de Howell-Jolly. Desde un punto de vista técnico, para llevar a cabo este método diagnóstico debe emplearse sangre fresca, ya que las bacterias tienden a desprenderse de los eritrocitos a las pocas horas de la extracción. Asimismo, la muestra debe teñirse de forma cuidadosa para evitar la aparición de falsos positivos asociados a artefactos de tinción. Las tinciones de tipo Romanowsky son las más utilizadas para este propósito (Sykes y Tasker, 2014).

Típicamente, los micoplasmas se visualizan en la superficie de los glóbulos rojos, de forma individual, en pares, o agrupados formando cadenas. En relación con esto, *M. haemocanis* tiene cierta tendencia a agruparse en cadenas (Figura 1), por lo que la identificación de figuras compatibles es relativamente más sencilla; en cambio, “*Ca. M. haematoparvum*”, con su menor tamaño (0,3 μm) y una disposición típicamente individual o en pares, tiende a pasar desapercibido con mayor facilidad (Barker y Tasker, 2022; Messick y Harvey, 2012). Además de la visualización del patógeno, en el examen citológico también se pueden observar hallazgos típicos de la enfermedad, como anisocitosis, policromasia, visualización de cuerpos de Howell – Jolly y presencia de autoaglutinación (Sykes y Tasker, 2014).

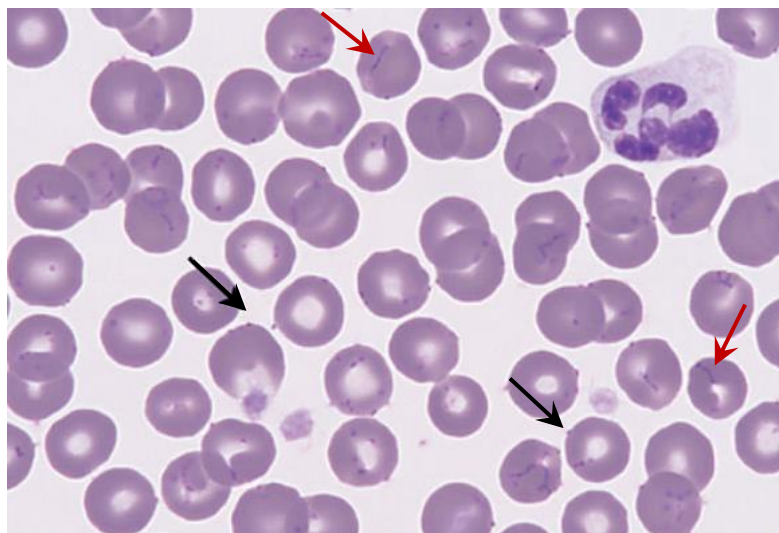


Figura 1. Frotis de procedente de un paciente canino infectado por *M. haemocanis*. Tinción Diff-Quick, 100X. Las flechas negras señalan la disposición individual de los microorganismos a lo largo de la superficie eritrocitaria, mientras que las flechas rojas muestran su agrupación característica en cadenas. Extraído de Kim *et al.* (2020).

1.5.3 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es la prueba de elección para el diagnóstico de la infección por micoplasmas hemotrópicos en el perro, ya que presenta una sensibilidad muy superior a la citología. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la PCR podría no detectar organismos en estados de infección subclínica, donde el animal presenta un bajo número de microorganismos en la sangre (Barker y Tasker, 2022; Criado – Fornelio *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2001).

Se pueden emplear tanto la PCR convencional como la PCR en tiempo real (qPCR) (Barker *et al.*, 2010; Criado – Fornelio *et al.*, 2003; Sharifiyazdi *et al.*, 2016; Willi *et al.*, 2009). En su mayoría, los ensayos se basan en la detección de segmentos del gen ARNr 16S específicos, pero, mientras que la PCR convencional sólo informa sobre la presencia del patógeno, la qPCR aporta además información cuantitativa, permitiendo realizar un seguimiento de la infección y evaluar la respuesta al tratamiento (Pitorri *et al.*, 2020). No obstante, debido al frecuente carácter subclínico de la hemoplasmosis en perros, un resultado positivo de PCR debe interpretarse con cautela, considerando siempre los signos clínicos, el historial del paciente y la posible presencia de enfermedades concurrentes o estados de inmunosupresión (Barker y Tasker, 2022).

1.6 Tratamiento

En cuanto a la terapia antimicrobiana específica, el empleo de tetraciclinas (doxiciclina, oxitetraciclina) o fluoroquinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina) durante 3 – 4 semanas se asocia de manera general con una mejoría clínica, aunque no siempre logra la eliminación completa de la infección (Barker y Tasker, 2022; Hulme – Moir *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2020; Lapsina *et al.*, 2023; Pitori *et al.*, 2012). Normalmente, la doxiciclina es el fármaco de primera elección, y se administra a una dosis de 5 - 10 mg/kg cada 24 horas por vía oral (Messick, 2003; Zobba *et al.*, 2020). En algunos casos, los tratamientos se extienden durante 6 – 8 semanas para incrementar la probabilidad de erradicar la infección; sin embargo, no existe ningún plan terapéutico que garantice la eliminación completa de la infección por micoplasmas hemotrópicos en ninguna especie. Dado que la respuesta al tratamiento no puede predecirse de manera empírica, idealmente debería monitorizarse mediante qPCR para asegurar que el número de microorganismos está disminuyendo. No obstante, esto puede no ser necesario si el animal muestra una respuesta rápida favorable al tratamiento (Barker y Tasker, 2022).

Además de la terapia específica, en algunos casos puede ser necesario un tratamiento de soporte. Por ejemplo, el empleo de glucocorticoides se ha sugerido para abordar el posible componente inmunomediado de la anemia; no obstante, su uso genera controversia, ya que, por un lado, su administración a dosis inmunosupresoras ha demostrado inducir un aumento en el número de hemoplasmas (Tasker, 2020) y, por otro, la mayoría de perros no suelen mostrar dicho

componente inmunomediado (Barker y Tasker, 2016; Warman *et al.*, 2010). Por lo tanto, su utilización rutinaria no está recomendada, reservándose para aquellos casos en los que el animal no responde a la terapia antimicrobiana o presenta evidencia de anemia inmunomediada. El tratamiento de soporte también incluye la administración de fluidoterapia intravenosa para corregir la deshidratación, así como la transfusión de sangre o de concentrado de hematíes en aquellos animales que presenten signos de anemia descompensada (taquicardia, debilidad, taquipnea, acidosis metabólica) (Barker y Tasker, 2022).

En general, si se instaura el tratamiento adecuado, el pronóstico de la hemoplasmosis en perros suele ser favorable, mostrando una mejoría clínica en 2 -3 días (Tasker, 2020). En algunos casos, los animales son refractarios a la terapia antimicrobiana inicial, lo cual puede requerir el cambio de antibiótico o la adición de un segundo antimicrobiano (Hulme – Moir *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de lograr la remisión de la enfermedad, en muchos casos los animales continúan infectados como portadores crónicos (Barker y Tasker, 2022; Zobba *et al.* 2020).

1.7 Prevención y control

En la actualidad no existen vacunas comerciales específicas disponibles para prevenir las infecciones por micoplasmas hemotrópicos en ninguna especie. Por tanto, se debe considerar como medida preventiva principal el control de los vectores mediante la desparasitación regular contra ectoparásitos (Barker y Tasker, 2016; 2022). Se recomienda especialmente el uso de ectoparasiticidas del grupo de las isoxazolinas como fluralaner y lotilaner, ya que, además de ser efectivos frente a pulgas y garrapatas, también lo son contra los ácaros de la sarna, que han sido asociados como un factor de riesgo para la hemoplasmosis canina (Novacco *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2022). Asimismo, en los colectivos donde la infección sea endémica, se recomienda evitar las interacciones agresivas entre perros, dado que estas pueden facilitar la transmisión del patógeno (Huggings *et al.*, 2023).

Por otra parte, dada la posibilidad de transmisión iatrogénica, es recomendable realizar pruebas de detección de hemoplasmas mediante PCR en perros que actúen como donantes de sangre (Sykes y Tasker, 2014), especialmente en países con altas tasas de prevalencia, si el donante tiene un historial de exposición a vectores artrópodos o si el perro receptor ha sido esplenectomizado (Wengi *et al.*, 2008). De igual manera, se debería considerar la realización rutinaria de PCR para la detección de hemoplasmas en pacientes que vayan a ser esplenectomizados o que estén bajo tratamiento con fármacos inmunosupresores, con el fin de prevenir el recrudecimiento de una posible infección crónica (Brinson y Messick, 2001).

2. OBJETIVOS

Con lo que se ha descrito anteriormente, los objetivos propuestos en el presente Trabajo de Fin de Grado fueron los siguientes:

- Estudiar la presencia de diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos en perros de Galicia con sospecha clínica de infección por hemopatógenos.
- Determinar la influencia de la edad, el sexo, la aptitud y la coinfección con *Babesia* spp. sobre la presencia de micoplasmas hemotrópicos en perros.
- Evaluar la relación entre la infección simple por micoplasmas hemotrópicos y la coinfección con *Babesia* spp. con respecto al valor de hematocrito en perros con sospecha de infección por hemopatógenos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Origen y características de las muestras incluidas

El presente estudio se llevó a cabo entre diciembre de 2023 y marzo de 2024. Durante este periodo, se analizaron un total de 60 muestras de sangre de perros procedentes de diferentes municipios de Galicia, en su mayoría de la provincia de Lugo (Figura 2).

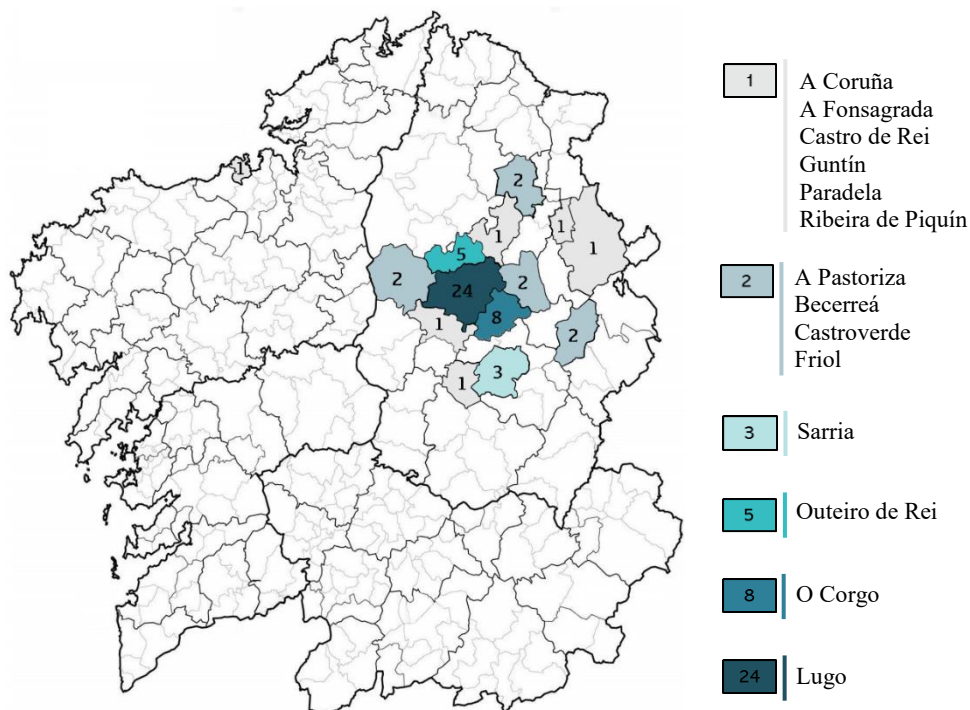


Figura 2. Mapa de Galicia mostrando la localización de los municipios de procedencia de los perros muestreados. Los diferentes tonos de azul/ gris y su número correspondiente indican la cantidad de muestras recolectadas en cada municipio.

Las muestras de sangre incluidas en este trabajo habían sido recolectadas previamente, entre los años 2021 y 2022, gracias a la colaboración de dos clínicas veterinarias ubicadas en el área de Lugo. En estas clínicas, se seleccionaron aquellos animales que acudían a consulta con sospecha de infección por hemopatógenos, basándose en la presencia de signos clínicos compatibles (mucosas pálidas, anorexia, decaimiento) e historial de exposición a ambientes con presencia de vectores. Las muestras se obtuvieron mediante punción venosa y se enviaron en refrigeración al laboratorio del grupo INVESAGA de la Facultad de Veterinaria de Lugo en tubos con anticoagulante EDTA. Las clínicas de origen registraron la edad, sexo y aptitud de cada animal muestreado, y esta información fue recogida en una base de datos. Adicionalmente, se adjuntó el hemograma de cada animal, obtenido en ambas clínicas con el analizador hematológico ProCyte Dx, IDEXX. Se registró el valor de hematocrito en esta misma base de datos, y se consideraron anémicos aquellos animales con un valor inferior al 37,3% de acuerdo con los valores de referencia indicados por el fabricante. En seis animales no fue posible recoger esta información.

Una vez en el laboratorio y siempre en las 48 horas posteriores a la recogida, las muestras de ADN se sometieron a una extracción de ADN con un kit comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), y posteriormente se analizaron para la presencia de *Babesia* spp. mediante PCR convencional dentro del marco de otro proyecto de investigación, caracterizando aquellas muestras positivas hasta el nivel de especie. De esta manera, para el presente estudio se dispuso de dichas extracciones de ADN, que se encontraban almacenadas a -20 °C, así como del resultado de la presencia de *Babesia* spp. en las mismas y su identificación a nivel de especie.

3.2 Análisis de laboratorio

3.2.1 PCR convencional

Las muestras de ADN obtenidas previamente se analizaron mediante PCR convencional para la detección de micoplasmas hemotrópicos. Para ello, se emplearon cebadores previamente descritos que emplean como diana el gen ARNr 16S y que permiten amplificar cualquier especie de hemoplasma (Criado – Fornelio *et al.*, 2003). Los reactivos empleados para la realización de la PCR y la concentración de cada uno pueden observarse en la tabla 2. El procedimiento completo de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. **Preparación de la mezcla maestra (*Master Mix*).** Se preparó una mezcla maestra con los reactivos necesarios para la reacción de PCR. Cada reactivo se añadió en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, utilizando las concentraciones finales que se detallan en la Tabla 2. A continuación, la mezcla se homogeneizó en un agitador de tubos y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 s.
2. **Preparación de los tubos de reacción.** Se rotuló un número de microtubos de 0,2 ml equivalente al número de muestras a procesar, y a continuación se añadieron 47 µl de la *Master Mix* a cada uno de ellos. Posteriormente, se agregaron 3 µl de muestra de ADN o control positivo/negativo a su tubo correspondiente, para un volumen final por muestra de 50 µl. Como control negativo se empleó agua bidestilada estéril (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, EE.UU.), y como control positivo se utilizó una muestra positiva a *Mycoplasma wenyonii* previamente identificada mediante secuenciación. Una vez preparados, los tubos se centrifugaron a 1600 rpm durante 1 minuto.
3. **Amplificación por PCR.** Los tubos de reacción se introdujeron en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EE.UU.) para llevar a cabo la amplificación del ADN presente en las muestras. El protocolo térmico empleado se detalla en la Tabla 3.

Tabla 2. Listado de reactivos empleados para la preparación de la *Master Mix*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final / reacción
Cl ₂ Mg ¹	50 mM	1,5 mM	1,5 µl
Tampón Tris – HCl ¹	10 x	1 x	5 µl
Desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) NZYMix ¹	2 mM	200 mM	5 µl
Cebador <i>Forward</i> : ATACGGCCCATATTCCTACG ²	10 µM	1 µM	5 µl
Cebador <i>Reverse</i> : TGCTCCACCACTTGTCA ²	10 µM	1 µM	5 µl
Taq polimerasa NZYTaq DNA Polymerase ¹	5 U/ µl	2,5 U	0,5 µl
Agua bidestilada estéril ³	-	-	25 µl
TOTAL			47 µl

¹ Suministrados por NZYTech Lda. (Lisboa, Portugal).

² Descritos por Criado-Fornelio *et al.*, 2003. Suministrados por Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania).

³ Suministrado por MO BIO Laboratories Inc. (Carlsbad, EE. UU).

Tabla 3. Protocolo térmico empleado para la amplificación de ADN.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1
95 °C	30 s	
60 °C	45 s	40
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	1

4. **Electroforesis en gel de agarosa.** Una vez completada la amplificación, se realizó una electroforesis para visualizar los productos de PCR. El procedimiento empleado fue el siguiente:
- **Preparación del gel de agarosa.** Se utilizaron geles de agarosa al 1%, preparados mezclando 60 ml de tampón TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA, PanReac-Applichem, Barcelona, España) con 0,6 g de agarosa (Agarose electrophoresis grade, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal). La mezcla se calentó y homogeneizó hasta estar completamente transparente, y a continuación se enfrió bajo agua fría y se añadieron 3 µl de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology Inc., Seúl, Corea del Sur), un colorante que se une de manera inespecífica a las cadenas de ADN permitiendo su visualización después de excitarlo bajo luz ultravioleta. La mezcla se vertió en un soporte nivelado con un peine colocado previamente, y se dejó solidificar durante 40 minutos.

- **Carga de muestras.** Una vez solidificado el gel, se retiró el peine, formándose así los pocillos. El gel se colocó en una cubeta de electroforesis y se cubrió con una solución TAE 1x. Se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder V, 100-1000 bp, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal) en el primer pocillo del gel. En una placa de microtitulación, se añadieron 2 µl de tampón de carga (6x NZYDNA loading dye, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal) y 10 µl de cada producto de PCR, y luego se cargó todo el volumen en los pocillos correspondientes del gel de agarosa.
- **Electroforesis.** Una vez cargadas todas las muestras, se cerró la cubeta y se configuraron los parámetros de electroforesis: 100 V, 400 mA, 37 min.
- **Visualización y análisis de resultados.** El gel de agar se reveló en el analizador de imagen GelDoc Go (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EE.UU.) para visualizar las bandas de ADN. Se consideraron positivas aquellas muestras con bandas a la misma altura que el control positivo y que correspondían aproximadamente con un peso de 600-700 pares de bases (pb) según el marcador de peso molecular (Figura 3).



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados con cebadores específicos para *Mycoplasma* spp. Primer y último carril: marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb; C+: control positivo; C. NEG: control negativo; MP01 – MP23: muestras problema.

3.2.2 Secuenciación del ADN

Una vez completado el análisis de las muestras, aquellas que resultaron positivas se remitieron a un laboratorio externo (STAB Vida Lda., Caparica, Portugal) donde fueron purificadas y secuenciadas mediante el método Sanger. Una vez procesadas, este laboratorio proporcionó dos cromatogramas para cada muestra, uno *forward* y otro *reverse*. Un cromatograma es una representación gráfica de una secuencia de ADN, en la que cada pico y su color correspondiente indican el nucleótido identificado para cada posición.

A continuación, se empleó el programa ChromasPro 2.1.4 (Technelysium, Brisbane, Australia) para ensamblar los dos cromatogramas obtenidos para cada producto de PCR, generando así una única secuencia consenso (Figura 4). Estas secuencias se revisaron manualmente para corregir ambigüedades en la asignación de bases y eliminar las regiones de baja calidad presentes al inicio y final de estas. Las secuencias consenso editadas se guardaron en formato FASTA.

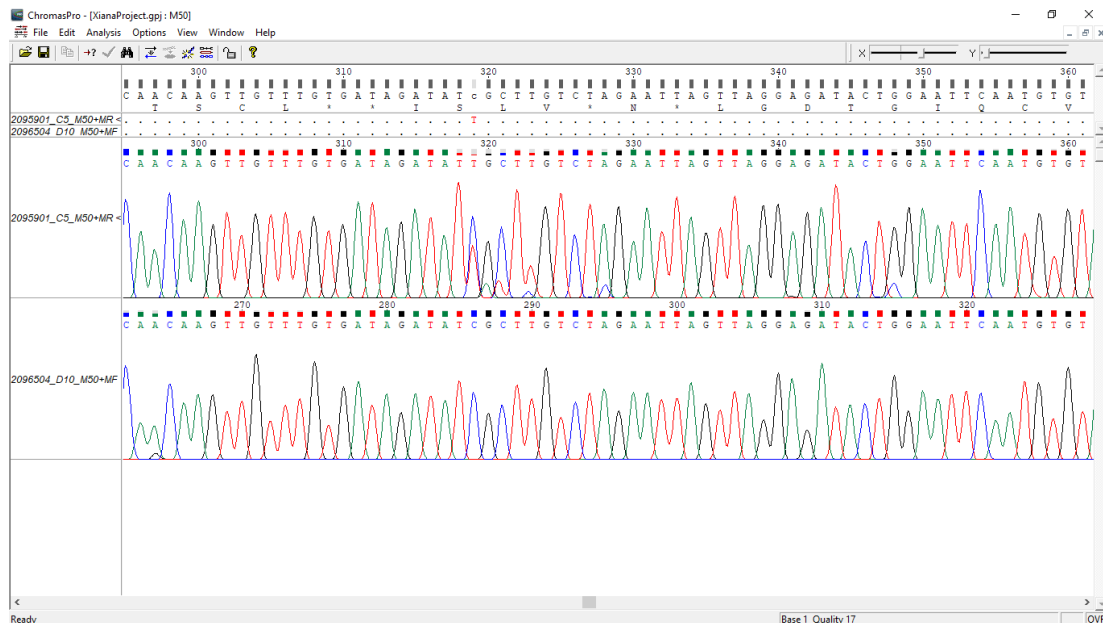


Figura 4. Vista del ensamblaje de los cromatogramas mediante el programa ChromasPro 2.1.4.

3.3 Análisis filogenético

3.3.1 Identificación de las especies de micoplasmas hemotrópicos

Cada secuencia consenso obtenida se comparó con secuencias de referencia previamente descritas y publicadas en la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cada una de las secuencias del estudio se identificó como la especie de *Mycoplasma* spp. más próxima según el porcentaje de homología obtenido.

3.3.2 Alineamiento y construcción del árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético, primero se realizó el alineamiento de las secuencias consenso obtenidas. Se utilizó el programa *Molecular Evolutionary Genetic Analysis X* (MEGA X) (Kumar *et al.*, 2018), seleccionando el algoritmo de alineamiento ClustalW. Las secuencias fueron revisadas y recortadas manualmente para asegurar que todas tuviesen la misma longitud (628 pb).

Además de las secuencias obtenidas en este trabajo, también se incluyeron en el alineamiento diferentes secuencias nucleotídicas de referencia de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), correspondientes a diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos. Adicionalmente, se incluyó la secuencia de una especie de micoplasma no hemotrópico (*Mycoplasma bovis*), filogenéticamente más distante del grupo de interés, para emplearla como raíz del árbol filogenético. La información de estas secuencias se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de referencia empleadas para la construcción del árbol filogenético, obtenidas de la base de datos GenBank.

<i>Mycoplasma</i> spp.	Secuencia empleada	Código de acceso GenBank
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Isolate cupsd254 16S ribosomal RNA gene partial sequence	MZ221174
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	16S ribosomal RNA gene partial sequence	EU145745
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	16S ribosomal RNA gene partial sequence	AY946266
<i>Mycoplasma ovis</i>	Isolate TA5 16S ribosomal RNA gene partial sequence	JF931135
<i>Mycoplasma parvum</i>	Gene for 16S ribosomal RNA partial sequence strain: Morioka9	AB610850
<i>Mycoplasma suis</i>	Strain HLJ/2010 16S ribosomal RNA gene partial sequence	KF740480
Candidatus Mycoplasma haematoparvum	Isolate cupsd243 16S ribosomal RNA gene partial sequence	MZ221181
Candidatus Mycoplasma haemominutum	16S ribosomal RNA gene partial sequence	AY297712
Candidatus Mycoplasma turicensis	Isolate D9 16S ribosomal RNA gene partial sequence	DQ464425
Candidatus Mycoplasma haemobos	Isolate cattle no. 18 16S ribosomal RNA gene partial sequence	EU367965
<i>Mycoplasma bovis</i> (outgroup)	Strain GDZJMbovis2014-1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	KM576849
Candidatus Mycoplasma haemovis	Isolate TA3 16S ribosomal RNA gene partial sequence	JF931133

A continuación, el alineamiento fue importado al programa jModel Test 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) para seleccionar el modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para la construcción del árbol filogenético. La selección del modelo se realizó en base al criterio estadístico AIC

(*Akaike Information Criterion*) implementado en este programa. El modelo de sustitución GTR + I + G (*General Time Reversible + Invariant sites + Gamma – distributed*) mostró el menor valor de AIC, por lo que fue seleccionado para la construcción del árbol.

Finalmente, el árbol filogenético se construyó utilizando un enfoque bayesiano empleando el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). Se implementó el modelo previamente seleccionado (GTR + I + G) y se configuró una cadena de Markov-Monte Carlo con 10.000.000 de generaciones y muestreo cada 1.000 generaciones. De esta forma, el árbol consenso final se construyó a partir de una muestra de 10.000 árboles.

3.4 Análisis estadístico

Con la información obtenida para los animales incluidos en el estudio, se elaboró una base de datos que incluyó la edad (categorizada en: ≤ 24 meses, > 24 meses), sexo y aptitud (categorizada en: caza, compañía) de los animales, así como el valor de hematocrito (HCT) y la presencia de *Babesia* spp. determinada previamente.

La positividad a micoplasmas hemotrópicos se analizó con relación a los factores: edad, aptitud, sexo y coinfección con *Babesia* spp. utilizando modelos de regresión logística. En primer lugar, se realizó un análisis univariante entre cada uno de los predictores anteriores y la presencia de hemoplasmas. Aquellos que presentaron un p-valor $< 0,1$ se seleccionaron para introducirlos en un modelo multivariante si fuese el caso.

Por otra parte, los datos obtenidos de las mediciones de hematocrito se utilizaron para evaluar la relación entre este parámetro y la presencia de infecciones simples y mixtas con micoplasmas hemotrópicos y *Babesia* spp. Para ello, se usaron modelos de regresión lineal donde el valor de hematocrito fue la variable dependiente, y la existencia de infecciones simples o mixtas con *Mycoplasma* spp., *Babesia vulpes* y *Babesia canis* fueron las variables independientes de cada modelo.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico R v. 4.4.1 (R Core Team, 2019). El ajuste de los modelos de regresión obtenidos se evaluó utilizando el paquete DHARMA (Harting, 2020) para el mismo programa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características de la población muestreada

El hematocrito de los animales muestreados presentó una mediana del 28,1% (rango: 11,2% - 41,1%). Se observó una proporción muy alta de perros con anemia (46/54; 76,7%), lo cual es esperable dado el criterio de inclusión en el presente estudio. Además, se recopiló información sobre la edad, sexo, aptitud y presencia de infección con *Babesia* spp. en los animales estudiados. El número de animales analizados en cada categoría de estas variables se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de las 60 muestras caninas recogidas en el presente estudio: edad, sexo, aptitud e infección por *Babesia* spp.

Variable	Número de animales (%)
Edad	
≤24 meses	8 (13,3 %)
>24 meses	46 (76,7 %)
Desconocido	6 (10,0 %)
Sexo	
Macho	33 (55,0 %)
Hembra	21 (35,0 %)
Desconocido	6 (10,0 %)
Aptitud	
Caza	16 (26,7 %)
Compañía	38 (53,3 %)
Desconocido	6 (10,0 %)
Infección por <i>Babesia</i> spp.	
Sí	36 (60,0 %)
No	24 (40,0 %)

La edad de los perros incluidos en el estudio osciló entre 6 meses y 13 años, con una mediana de 5 años. La mayor parte fueron > 24 meses (76,7 % frente a 13,3 % ≤ 24 meses), lo cual sugiere que no hay una sobrerrepresentación de animales jóvenes en la población estudiada. En cuanto al sexo, la proporción de machos (55 %) fue superior a la de hembras (35 %). Respecto a la variable “aptitud”, la mayoría de animales incluidos fueron de compañía (53,3 %), y los restantes eran de caza (26,7 %). Por último, respecto a la infección por *Babesia* spp., un 60 % de los animales resultaron ser positivos, lo cual es consistente con el tipo de animales estudiados.

4.2 Presencia de micoplasmas hemotrópicos

De las 60 muestras, 14 resultaron positivas a diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos, (23,3 %). La hemoplasmosis canina no ha sido ampliamente estudiada en España. Solamente existen dos estudios epidemiológicos realizados para estimar la prevalencia en la población general de perros. Estos han sido realizados en Cataluña, y no hay información previa en Galicia. Los resultados de estos dos estudios mostraron prevalencias muy variables entre ellos: 14,3 %

(Roura *et al.*, 2010) y 2,5 % (Novacco *et al.*, 2010). No obstante, Novacco *et al.* (2010) señalaron que el hecho de que los animales recibiesen tratamientos ectoparasiticidas de forma regular y residiesen en hogares particulares pudo influir en la baja prevalencia obtenida en su estudio. Por el contrario, estos factores no se evaluaron en el estudio de Roura *et al.* (2010).

Respecto a otros trabajos más similares desde un punto de vista metodológico, los resultados del presente estudio mostraron un porcentaje de animales positivos a micoplasmas hemotrópicos superior. Así, en animales con signos compatibles con anemia de Francia e Irán se encontró un 7,5 % y un 11,53 % de positividad (Bouzouraa *et al.* 2017; Hasiri *et al.*, 2016), aunque las diferencias observadas también se pueden deber a diferentes diseños metodológicos.

Los resultados obtenidos en este estudio no deben interpretarse como un reflejo de la prevalencia de micoplasmas hemotrópicos en la población general de perros en Galicia, sino que reflejan la prevalencia de hemoplasmosis en pacientes caninos con sospecha de infección por hemoparásitos. La prevalencia de hemoplasmas en la población canina general ha sido evaluada en diferentes países con diferentes diseños y propósitos, encontrando valores muy variables (rango: 1,2 % - 56,7 %) (Barker y Tasker, 2022; Beus *et al.*, 2024). Así, en países vecinos se reportaron prevalencias moderadas en Francia (15,4 %) (Kenny *et al.*, 2010) e Italia (9,5 % - 4,5 %) (Novacco *et al.*, 2010; Ravagnan *et al.*, 2017) y más altas en Portugal (40 %) (Novacco *et al.*, 2010), aunque este último estudio presentó un tamaño muestral bajo e incluyó a animales que procedían solamente de colectividades, lo que puede favorecer una mayor prevalencia (Kemming *et al.*, 2004; Novacco *et al.*, 2010; Ravagnan *et al.*, 2017). Respecto a otros países europeos, se detectaron prevalencias del 15,3 % – 38,3 % en Turquía (Aktas y Ozubek; 2017, 2018), 10,7 % en Grecia (Hofman *et al.*, 2019) y 1,2 % en Suiza (Wengi *et al.*, 2008). En otras regiones geográficas más distantes, se descubrieron prevalencias igualmente dispares: 56,7% en Irán, 39,7 % en Trinidad, 24,8 % Chile, 20 % en Tanzania, 17,9 % en Cuba, 11,9 % -1,3 % en EE.UU., 11,7 % en Australia y 8,7 % en Sudán (Barker *et al.*, 2010; Beus *et al.*, 2024; Cannon *et al.*, 2016; Compton *et al.*, 2012; Hii *et al.*, 2012; Inokuma *et al.*, 2006; Roblejo – Arias *et al.*, 2022; Soto *et al.*, 2017). En general, las diferentes poblaciones de perros seleccionadas, la distinta climatología, el grado de exposición a ectoparásitos y las diferencias en los ensayos de PCR utilizados en estos trabajos pueden ser responsables de la variación observada en la prevalencia (Compton *et al.*, 2012).

Además, la presencia de micoplasmas hemotrópicos también se ha constatado en cánidos silvestres de Galicia. Así, en Galicia y Asturias se encontró la presencia de *M. haemocanis* en 6 de 37 lobos (16,2 %) (Millán *et al.*, 2018). Este hallazgo no es sorprendente, ya que el perro y el lobo están estrechamente emparentados, y sugiere que podría haber una presencia considerable de hemoplasmas en el noroeste de España.

4.3 Especies de micoplasmas hemotrópicos y análisis filogenético

Las catorce secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S analizadas mostraron una identidad >98% con diferentes secuencias previamente descritas y depositadas en el GenBank. Doce de estas secuencias correspondieron a la especie “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (*CMhp*), mientras que solamente dos de ellas resultaron ser *Mycoplasma haemocanis* (*Mhc*), suponiendo esto que el 86 % de los animales positivos estaban infectados por *CMhp*, y solo el 14 % por *Mhc*. Así, en los animales analizados se encontraron las dos especies de micoplasmas hemotrópicos consideradas como propias de los perros, con porcentajes de detección del 20 % (12/60) para *CMhp* y 3 % (2/60) para *Mhc*, siendo *CMhp* la especie más prevalente.

Estos resultados contrastan con lo notificado en otros estudios. Aunque los resultados varían entre los diferentes trabajos, de forma general, *M. haemocanis* se considera la especie más frecuente en perros (Barker y Tasker, 2016). Así lo demostraron Roura *et al.* (2010) en perros de España (*Mhc* 14,3 %, *CMhp* 0,6 %) y Ravagnan *et al.* (2017), Hofman *et al.* (2019) y Wengi *et al.* (2008) en Italia, Grecia y Suiza, respectivamente. En otros continentes, estudios en Cuba (*Mhc* 15,1 %, *CMhp* 4,4 %), Tanzania (*Mhc* 19 %, *CMhp* 1 %) y Australia (*Mhc* 17,7 %, *CMhp* 2,3 %) mostraron resultados similares (Barker *et al.*, 2010; Hii *et al.*, 2012; Roblejo – Arias *et al.*, 2022). Por otro lado, otros trabajos han descrito prevalencias similares de ambos patógenos (*Mhc* 4,5 % y *CMhp* 4,3 % en Turquía; *Mhc* 9 % y *CMhp* 8 % en Rumanía) (Aktas y Ozubek, 2018; Anderson *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque no sea lo más frecuente, los resultados de este estudio concuerdan con los hallazgos de Novacco *et al.* (2010) en España e Italia, Kenny *et al.* (2008) en Francia e Inokuma *et al.* (2006) en Sudán, donde *CMhp* resultó ser más prevalente que *Mhc*.

En este estudio no se encontraron especies de hemoplasmas propias de otros animales, a diferencia de lo observado en investigaciones previas realizados en Australia, Japón, Chile y EE.UU. (Hii *et al.*, 2012; Obara *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2017; Varanat *et al.*, 2011). En estos trabajos, se detectaron perros positivos a “*Ca. M. haemobos*”, “*Ca. M. haemominutum*”, “*Ca. M. turicensis*” y *M. ovis*, especies propias de otros animales domésticos. Este hallazgo es inusual, siendo los estudios mencionados los únicos que lo han reportado, y sugiere que la ausencia de este fenómeno en el presente trabajo es coherente con lo esperado. Sin embargo, la probabilidad de encontrar hemoplasmas propios de otros animales domésticos podría aumentar si se hubiesen seleccionado perros con contacto estrecho con potenciales portadores. Por ejemplo, podría ser más probable encontrar *M. ovis*, *M. wenyonii* o “*Ca. M. haemobos*” en perros de trabajo o que viven en explotaciones ganaderas, ya que son micoplasmas que afectan a distintos rumiantes domésticos.

En relación con el análisis filogenético realizado para determinar las relaciones evolutivas de las secuencias nucleotídicas obtenidas en comparación con otros hemoplasmas descritos, se generó el árbol filogenético que se presenta en la Figura 5.

En la parte inferior del árbol filogenético se encuentra la especie de micoplasma no hemotrópico *M. bovis*, seleccionada como *outgroup* con el fin de ayudar a establecer la dirección de la evolución y a identificar el ancestro común más reciente de las secuencias en estudio.

Respecto al clado superior, que incluye a los micoplasmas hemotrópicos, el análisis filogenético reveló que las secuencias de hemoplasmas caninos descritas en este estudio se agruparon en dos subclados bien diferenciados, con especies de hemoplasmas estrechamente relacionadas entre sí. Las dos secuencias de *M. haemocanis* obtenidas, junto con la secuencia de referencia de *M. haemocanis*, se agruparon en el mismo subclado que la secuencia de referencia de *M. haemofelis* (Figura 5, subclado verde), indicando una estrecha relación filogenética entre ambas especies. Por otro lado, las secuencias de “*Ca. M. haematoparvum*” se agruparon junto con la secuencia de referencia de esta misma especie en el subclado que incluye la secuencia de referencia de “*Ca. Mycoplasma haemominutum*” (Figura 5, subclado azul), indicando su estrecha relación filogenética. Esto es consistente con lo descrito en estudios filogenéticos previos sobre hemoplasmas, que identificaron esta misma división taxonómica (Hicks *et al.*, 2014; Sykes *et al.*, 2005).

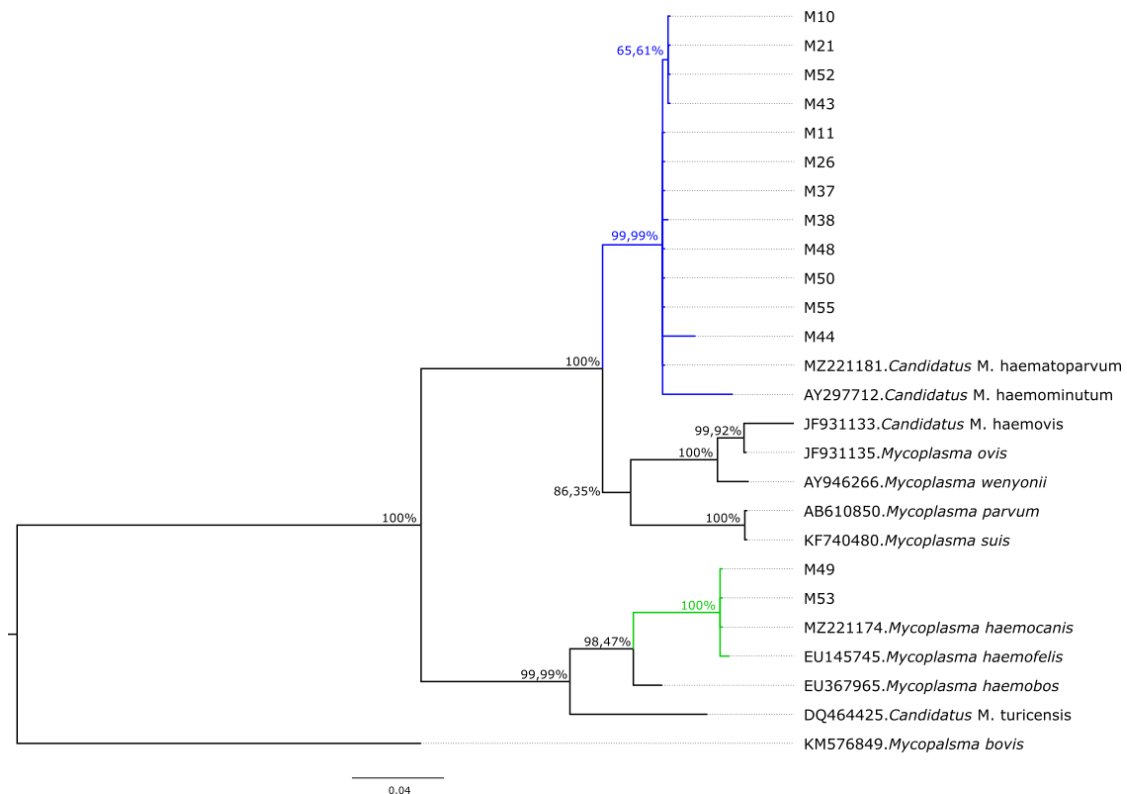


Figura 5. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias del gen ARNr 16S de hemoplasmas amplificadas en los perros positivos (“*Ca. M. haematoparvum*”: M10, M11, M21, M26, M37, M38, M43, M44, M48, M49, M50, M52, M53, M55; *M. haemocanis*: M49, M53) y secuencias de especies relacionadas obtenidas de GenBank, construido mediante inferencia bayesiana. *M. bovis* se incluyó como *outgroup* para realizar el enraizamiento. Las distancias evolutivas corresponden a la escala indicada en la pie de la Figura (4% divergencia genética). Los valores porcentuales de probabilidad posterior se indican a la izquierda de los nodos del árbol. Se destacan en azul y verde los dos subclados en los que se incluyeron las diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos encontradas en este estudio.

El árbol filogenético no reveló ninguna subclasificación significativa entre las secuencias obtenidas en perros de Galicia tanto para *M. haemocanis* como para “*Ca. M. haematoparvum*”, lo que indica que existe una baja variabilidad genética del ARNr 16S en las cepas circulantes en Galicia.

En la herramienta BLAST, el 100 % de las secuencias depositadas en GenBank presentaron una homología superior al 95 % respecto a las secuencias obtenidas en este trabajo, demostrando una baja variabilidad geográfica. Esto es consistente con lo indicado por Roblejo-Arias *et al.* (2022), que indicaron que la homología entre las cepas de estas especies no permite determinar su origen geográfico. Este hecho se ve respaldado por estudios en los que se demuestra que la secuenciación parcial del gen ARNr 16S no proporciona la suficiente información para distinguir entre especies de hemoplasmas estrechamente relacionadas, en comparación con secuencias de otras regiones del genoma, como el gen que codifica la ribonucleasa P (Birkenheuer *et al.*, 2002; Tasker *et al.*, 2003) o los genes *gapA* y *dnaK* (Hicks *et al.*, 2014), que sí permiten realizar esta distinción. En esta misma línea, algunos autores han sugerido que idealmente se debería obtener la secuenciación completa del gen ARNr 16S para proporcionar la caracterización taxonómica a nivel de especie y cepa, ya que las regiones variables cubiertas por su secuenciación parcial no son suficiente para capturar la diversidad representada cuando se secuencia el gen completo (Johnson *et al.*, 2019).

4.4 Características de la población positiva a micoplasmas hemotrópicos y análisis de los factores de riesgo asociados.

La Tabla 6 describe las características de los animales que resultaron positivos a hemoplasmas caninos. La mayoría de pacientes infectados fueron de mediana edad (mediana: 76,5 meses; 6, 4 años), sexo masculino (11/14) y eran empleados para caza (10/14). Muchos de ellos (9/14) mostraron infección concomitante por alguna especie de *Babesia* spp., y todos a excepción de uno mostraron anemia.

A partir de estos datos, se calculó la proporción de perros positivos respecto a cada variable, aportando una visión comparativa de la prevalencia de micoplasmas hemotrópicos según estos factores en los animales estudiados (Figura 6). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: el 26% de los animales > 2 años resultaron positivos, frente al 25 % de aquellos ≤ 2 años; un 33 % de los machos resultaron positivos en comparación con el 14 % de las hembras; y el 62,5 % de los animales de caza estaban infectados por hemoplasmas, en contraposición con el 12,5 % de los animales de compañía. Con relación a la coinfección con *Babesia* spp., el 25 % de los animales positivos a este patógeno resultaron serlo también a micoplasmas hemotrópicos, mientras que el 21 % de los animales negativos a *Babesia* spp. resultaron ser positivos a hemoplasmas caninos.

Tabla 6. Características de los animales positivos a la PCR para la detección de hemoplasmas. Se muestra también la identificación a nivel de especie de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

Código muestra	Edad (meses)	Sexo ¹	Aptitud	<i>Babesia</i> spp. ²	% HCT	Especie hemoplasma ⁴
M10	86	♂	Caza	Sí (<i>B. vulpes</i>)	17	<i>CMhp</i>
M11	50	♂	Caza	Sí (<i>B. vulpes</i>)	19	<i>CMhp</i>
M21	23	♂	Compañía	No	27	<i>CMhp</i>
M26	64	♂	Caza	No	28	<i>CMhp</i>
M37	78	♂	Compañía	Sí (<i>B. vulpes</i>)	32	<i>CMhp</i>
M38	82	♀	Caza	No	18	<i>CMhp</i>
M43	67	♂	Compañía	Sí (<i>B. canis</i>)	28	<i>CMhp</i>
M44	75	♂	Compañía	Sí (<i>B. canis</i>)	25	<i>CMhp</i>
M48	91	♀	Caza	No	21	<i>CMhp</i>
M49	108	♂	Caza	Sí (<i>B. vulpes</i>)	27	<i>Mhc</i>
M50	120	♂	Caza	Sí (<i>B. vulpes</i>)	25	<i>CMhp</i>
M52	87	♂	Caza	No	44	<i>CMhp</i>
M53	24	♂	Caza	Sí (<i>B. vulpes</i> , <i>B. canis</i>)	30	<i>Mhc</i>
M55	62	♀	Caza	Sí (<i>B. vulpes</i>)	25	<i>CMhp</i>

¹ ♂: macho/ ♀: hembra

² Casos en los que existía coinfección con *Babesia* spp. Entre paréntesis se describe la especie/s a las que resultaron positivas.

⁴ *CMhp*: "Candidatus Mycoplasma haematoparvum"; *Mhc*: *Mycoplasma haemocanis*.

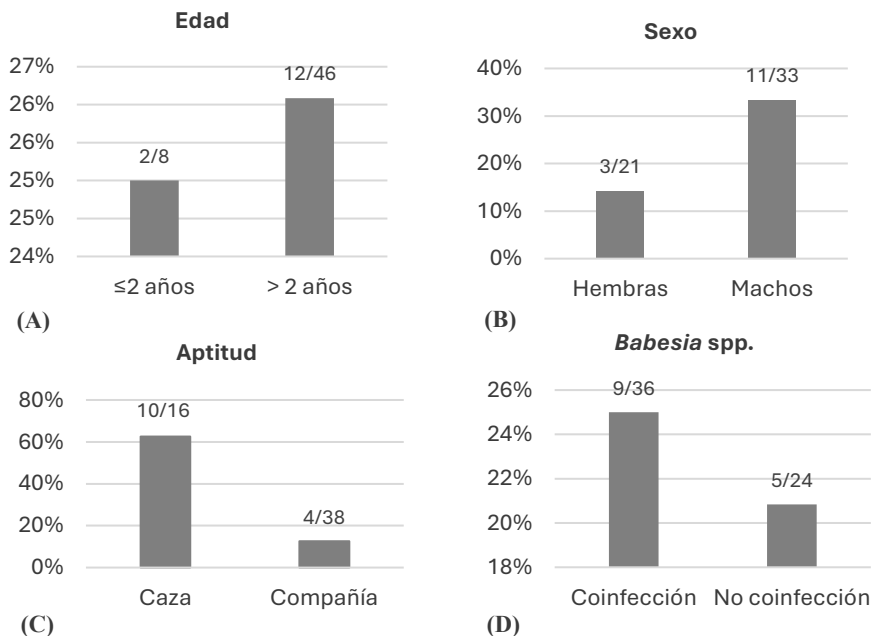


Figura 6. Diagramas de barras que representan el porcentaje de perros positivos a micoplasmas hemotrópicos en relación con diferentes factores epidemiológicos. (A) Porcentaje de animales positivos distribuidos por grupos de edad. (B) Porcentaje de animales positivos segregados por sexo. (C) Porcentaje de animales positivos según su aptitud. (D) Porcentaje de animales positivos en relación con la coinfección por *Babesia* spp.

Estos datos son meramente descriptivos y relativos a la población estudiada, por lo que no pueden ser interpretados como un reflejo de la prevalencia de infección por hemoplasmas en los distintos sectores de la población canina descritos. Así, con el fin de determinar si las diferencias encontradas entre los diferentes grupos eran significativas, se realizó un análisis estadístico univariante para cada una de estas variables (Tabla 7). Dado que solo 2 animales resultaron positivos a *CMhp*, el análisis estadístico se realizó para el conjunto de micoplasmas hemotrópicos, y no para cada una de las especies. De acuerdo con el análisis de regresión, las variables “edad”, “sexo” e “infección con *Babesia* spp.” no mostraron una influencia significativa sobre la presencia de micoplasmas hemotrópicos en la población estudiada (p-valor > 0,05). Sin embargo, la variable “aptitud” sí presentó una asociación significativa con la positividad a micoplasmas hemotrópicos (p-valor < 0,05).

Tabla 7. Modelo de regresión logística univariante de los factores de riesgo (edad, sexo, aptitud, infección con *Babesia* spp.) asociados a la infección por hemoplasma.

Variable	Total animales	PCR hemoplasma		OR	95% CI	p-valor
		Positiva	Negativa			
Edad (n = 54)						
≤24 meses	8	2	6	*	0,2-7,9	0,948
>24 meses	46	12	34	1,05		
Sexo (n = 54)						
Hembra	21	3	18	*	0,8-14,8	0,130
Macho	33	11	23	3,00		
Aptitud (n = 54)						
Compañía	38	4	34	*	3,6- 67,7	<0,001
Caza	16	10	6	14,17		
<i>Babesia</i> spp. (n = 60)						
No	24	5	19	*	0,4 - 4,7	0,709
Sí	36	9	27	1,27		

*Categoría de referencia. OR, Odds Ratio; 95% CI, Intervalo de confianza al 95 %;

El análisis de regresión no encontró diferencias significativas entre la prevalencia de micoplasmas hemotrópicos y la edad (p-valor > 0,05). La asociación de la exposición con hemoplasmas y la edad no está clara en la bibliografía. Los resultados de este estudio concuerdan con otros en los que tampoco se encontró esta asociación estadística (Barker *et al.*, 2010; Happi *et al.*, 2018; Ravagnan *et al.*, 2017; Roura *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008). Sin embargo, investigaciones de otros autores determinaron que los animales de mayor edad tenían una mayor probabilidad de infección por micoplasmas hemotrópicos (Aktas y Ozubek, 2018; Beus *et al.*, 2024; Soto *et al.*, 2016), lo que podría atribuirse al mayor tiempo de exposición al patógeno a lo largo de la vida o a una posible infección crónica, ya que muchos de los animales infectados permanecen como portadores a largo plazo (Soto *et al.*, 2016). Por otra parte, Novacco *et al.* (2010) encontraron mayor prevalencia en jóvenes, y lo atribuyeron a una mayor tasa de exposición de estos animales

a las garrapatas, debido bien a su mayor actividad o a que la mayor parte de los jóvenes incluidos en su estudio procedían de colectividades.

En cuanto al sexo, aunque hubo un mayor porcentaje de positivos en machos, no se encontró ninguna asociación significativa entre el sexo y la positividad a hemoplasmas (p -valor $> 0,05$), lo cual concuerda con lo descrito por Hasiri *et al.* (2016), Novacco *et al.* (2010), Roura *et al.* (2010) y Wengi *et al.* (2008), entre otros. En nuestro estudio, el mayor número de machos positivos podría deberse a que la mayoría de los perros de caza eran machos (11 de los 16), y esta aptitud se relacionó estadísticamente con una mayor positividad. Aunque es común no observar esta asociación, algunos estudios encontraron que los perros machos tenían una mayor probabilidad de ser positivos a micoplasmas hemotrópicos (Barker *et al.* 2010; Sasaki *et al.* 2008; Soto *et al.*, 2016). Esta mayor positividad en los machos se atribuyó a un mayor contacto agresivo entre animales, más frecuente en este sexo, durante el cual se podría transmitir la infección por micoplasmas (Aktas y Ozubek, 2017; de Faria Valle *et al.*, 2014).

El análisis estadístico mostró una asociación significativa entre la aptitud y la positividad a hemoplasmas (p -valor $< 0,05$; OR =14,17), indicando que los perros de caza se infectan con mayor frecuencia. Este hallazgo se explica probablemente por la mayor exposición a ectoparásitos en este tipo de animales, que están más en contacto con el medio ambiente. Esto es consistente con otros estudios en los que se observó una asociación estadística significativa entre la positividad a hemoplasmas y la infestación por garrapatas (Happi *et al.*, 2018), y garrapatas y pulgas (de Faria Valle *et al.*, 2014). De forma similar, también se ha observado una mayor exposición en perros vagabundos, más expuestos a vectores y por tanto a la infección (Aktas y Ozubek, 2018; Ravagnan *et al.*, 2017). El único vector demostrado experimentalmente es *Rhipicephalus sanguineus* (Seneviratna *et al.*, 1973), respaldado adicionalmente por evidencia indirecta en diversos estudios epidemiológicos que asociaron una mayor prevalencia de hemoplasmosis en áreas donde este vector está presente (Inokuma *et al.*, 2006; Novacco *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008). Sin embargo, en el noroeste de España la especie de garrapata predominante es *Ixodes ricinus* y, aunque también se ha detectado la presencia de *R. sanguineus* en esta región (71% *I. ricinus* vs. 15% *R. sanguineus*) (Peña López, 2019), de acuerdo con lo que defienden algunos autores (Beus *et al.*, 2024; Millán *et al.*, 2018; Suh *et al.*, 2017), parece probable que otros vectores estén implicados en la transmisión de los hemoplasmas caninos.

La mayor positividad en animales de caza también puede estar relacionada con que estos animales conviven más frecuentemente con otros perros en caniles. En este sentido, algunos estudios han encontrado asociación entre la positividad a hemoplasmas y la residencia en protectoras u otras colectividades (Aktas y Ozubek, 2018; Kemming *et al.*, 2004a; Novacco *et al.*, 2010; Ravagnan *et al.*, 2017). Esto podría ser debido a que en estos ambientes se favorezca una mayor densidad de garrapatas, aunque cabe mencionar que en colectivos también pueden ser más frecuentes las

interacciones agresivas, que se han sugerido como una posible forma de transmisión de micoplasmas hemotrópicos (de Faria Valle *et al.*, 2014; Huggings *et al.*, 2023; Sasaki *et al.*, 2008).

No se encontró relación entre la infección con *Babesia* spp. y la presencia de micoplasmas hemotrópicos (p -valor $> 0,05$). Esta falta de asociación estadística es consistente con los hallazgos de Andersson *et al.* (2017) y Happi *et al.* (2018), quienes tampoco encontraron una relación significativa entre estas infecciones en sus estudios. Contrariamente, otras investigaciones (Aktas y Ozubek, 2018; Cannon *et al.*, 2016) demostraron una asociación significativa entre la infección con *Babesia* spp. y micoplasmas hemotrópicos, sugiriendo una transmisión común a través de vectores artrópodos, lo que indirectamente sugiere una exposición compartida a estos patógenos en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, los resultados de este estudio no son consistentes con esta hipótesis.

4.5 Efecto de los micoplasmas hemotrópicos sobre el hematocrito y análisis del efecto de la coinfección con *Babesia* spp.

No se observaron diferencias notables en cuanto a los valores de HCT descritos en perros infectados con micoplasmas hemotrópicos en relación con los observados en perros libres de esta infección (26 % y 30,7 % respectivamente) (Figura 7.A). Al considerar las coinfecciones con *Babesia* spp. (Figura 7.B), se observó que la mediana del hematocrito tampoco fue notoriamente inferior en las infecciones mixtas con hemoplasmas (25,1 % frente a 26,9 %).

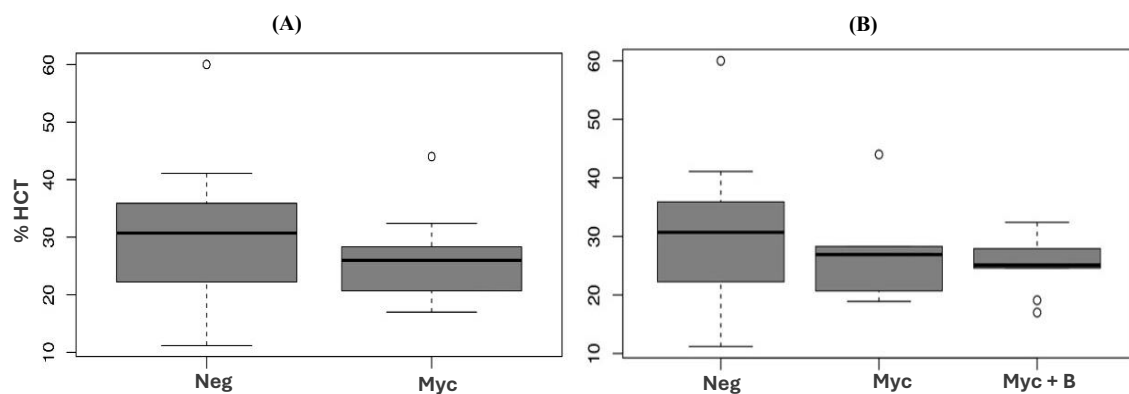


Figura 7. Valores de hematocrito (HCT) en perros con y sin infecciones por micoplasmas hemotrópicos (A) e incluyendo la coinfección simultánea con *Babesia* spp. (B). Neg, negativo; Myc, micoplasma hemotrópico; B, *Babesia* spp.

Cuando se analizaron todas las posibles combinaciones de coinfección (Figura 8), la mediana del hematocrito más baja se encontró en la infección única por *Babesia vulpes* (19,1 %), seguida de la coinfección entre *B. vulpes* y micoplasmas hemotrópicos (25,1 %). No se observó un patrón que indicase que la coinfección entre micoplasmas hemotrópicos y *Babesia* spp. llevase a una reducción mayor del hematocrito debido a un posible efecto sinérgico de estos microorganismos.

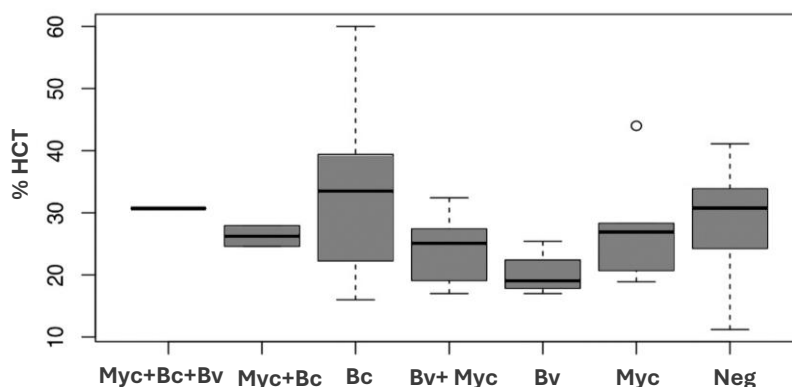


Figura 8. Valores de hematocrito (HCT) en perros para cada combinación de infección micoplasmas hemotrópicos y *Babesia* spp. Neg, negativo; Myc, micoplasma hemotrópico; Bv, *Babesia vulpes*; Bc, *Babesia canis*.

Se llevó a cabo un análisis estadístico de regresión lineal para evaluar el efecto de estas infecciones sobre el hematocrito (Tabla 8). El resultado del modelo no mostró que se produjese una disminución significativa el HCT en infecciones simples con micoplasmas hemotrópicos respecto al resto de animales estudiados (p-valor > 0,05). Sin embargo, infecciones simples con *B. vulpes* sí se asociaron a una mayor bajada del hematocrito (p-valor < 0,05). Finalmente, las coinfecciones con hemoplasmas no se asociaron a una mayor bajada del HCT en ningún caso (p-valor > 0,05).

Tabla 8. Resultados del análisis de regresión entre el hematocrito (%) y la presencia de infecciones simples y mixtas con *Mycoplasma* spp. y *Babesia* spp.

	<i>Mycoplasma</i> spp.			<i>Babesia vulpes</i>			<i>Babesia canis</i>		
	n	Coef. (CI95%)	p-valor	n	Coef. (CI95%)	p-valor	n	Coef. (CI95%)	p-valor
Negativo	46	*	*	48	*	*	35	*	*
Inf. simple	5	-1,9 (-10,4 – 6,5)	0,648	5	-10,1 (-19,0 – (-1,1))	0,028	22	5,1 (0,1 – 10,1)	0,050
Inf. mixta	9	-4,2 (-10,8 – 2,4)	0,204	7	-4,9 (-11,9 – 2,0)	0,160	3	0,9 (-9,7 – 11,4)	0,871

* Categoría de referencia

n: n° animales; Coef.: coeficiente; CI95%: intervalo de confianza al 95% del coeficiente.

En el presente estudio, debido a las características de la población incluida, es difícil evaluar el impacto clínico de los micoplasmas hemotrópicos en perros. Nueve de los 14 perros que resultaron positivos estaban coinfectados con *Babesia* spp., además de que el 77 % de los animales incluidos mostraban un HCT inferior al rango fisiológico y no se habían explorado otras causas de anemia. Los hemoplasmas en perros suelen cursar de forma asintomática (Messick, 2004). No obstante, recientemente se comunicó en el País Vasco el caso de un perro inmunocompetente con historial de infestación por garrapatas que desarrolló una infección aguda por *M. haemocanis* (García Luccioni y Rodríguez López, 2018), y esto también fue reportado por Sharifiyazdi *et al.* (2014) en Irán. Además, se ha demostrado que en animales esplenectomizados o inmunodeprimidos

puede cursar de forma aguda (Hulme-Moir *et al.*, 2010; Kemming *et al.*, 2004b; Kim *et al.*, 2020; Lapsina *et al.*, 2023; Pitorri *et al.*, 2012; Zobba *et al.*, 2020). Esto sugiere que esta patología debería considerarse en el diagnóstico diferencial de pacientes caninos anémicos con historial de exposición a ectoparásitos.

La presencia de micoplasmas hemotrópicos en animales con sospecha de hemopatógenos puede sugerir su implicación en la clínica observada, aunque esto no se puede confirmar en este estudio debido a su diseño. Además, los resultados obtenidos muestran que las infecciones con hemoplasmas no parecen estar asociados con valores de hematocrito más bajos en la especie canina. Esto concuerda con los hallazgos de Aquino *et al.* (2016), Barker *et al.* (2010), Hasiri *et al.*, (2016), Happi *et al.* (2018), Roura *et al.* (2010) y Wengi *et al.* (2008). Tampoco se encontraron valores de HCT más bajo cuando se presentaron en coinfección con *Babesia* spp. Un posible efecto sinérgico entre hemoplasmas y *Babesia* spp. fue propuesto por Sonoda *et al.* (1978) (revisado por Sasaki *et al.* 2008). Sin embargo, otras publicaciones en las que se incluyeron animales positivos a ambos patógenos no observaron un agravamiento de la sintomatología clínica, de forma similar a lo que se observa en este estudio (Cannon *et al.*, 2016; Happi *et al.*, 2018). Así, a pesar de que ambos patógenos infectan los eritrocitos, la coinfección entre ellos no parece implicar un peor curso clínico.

Por último, este estudio cuenta con ciertas limitaciones debido al número relativamente pequeño de casos analizados ($n = 60$), a que se realizó mediante un muestreo dirigido con el fin de maximizar el número de animales positivos a hemopatógenos y a que el limitado número de animales positivos impidió realizar un análisis individual para las diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos encontradas. No obstante, estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento de los hemoplasmas caninos, y, hasta donde alcanza el conocimiento de la autora, constituyen el primer estudio molecular de la ocurrencia de infecciones causadas por *M. haemocanis* y “*Ca. M. haematoparvum*” en perros de Galicia.

5. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, el 23,3% de perros con sospecha clínica de infección por hemopatógenos estaban infectados con micoplasmas hemotrópicos.
2. Se identificaron molecularmente las dos especies de micoplasmas hemotrópicos consideradas propias de la especie canina: *Mycoplasma haemocanis* y “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”. *M. haemocanis* resultó ser la especie más frecuente (12/14 animales).
3. La aptitud del perro fue identificada como un factor de riesgo para la infección con micoplasmas hemotrópicos; así, los animales de caza presentaron una mayor probabilidad de estar infectados en comparación con los de compañía. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en función del sexo, la edad y la coinfección con *Babesia* spp.
4. La infección por micoplasmas hemotrópicos no demostró estar asociada a los valores más bajos de hematocrito en perros con sospecha de infección por hemopatógenos, lo que refuerza la idea de que estas infecciones no suelen tener un curso grave en los perros.
5. No se observó una disminución significativa en los valores de hematocrito en los perros coinfectados con micoplasmas hemotrópicos y *Babesia* spp. en comparación con aquellos infectados únicamente con micoplasmas, lo que parece descartar en principio un efecto sinérgico de estas infecciones en relación con este parámetro.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aktas, M., y Ozubek, S. (2017). Molecular survey of haemoplasmas in shelter dogs and associations with *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 457-461. <https://doi.org/10.1111/mve.12244>
- Aktas, M., y Ozubek, S. (2018). A molecular survey of hemoplasmas in domestic dogs from Turkey. *Veterinary microbiology*, 221, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.004>
- Andersson, M. O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Waldenström, J., Dobler, G., y Chițimia-Dobler, L. (2017). Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. *Parasites and vectors*, 10(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2092-x>
- Aquino, L. C., Kamani, J., Haruna, A. M., Paludo, G. R., Hicks, C. A., Helps, C. R., y Tasker, S. (2016). Analysis of risk factors and prevalence of haemoplasma infection in dogs. *Veterinary parasitology*, 221, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.014>
- Barker, E. N., Tasker, S. (2016). Hemoplasmosis. En M. J. Day (Ed.) *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat* (2ª ed., pp. 97 - 107). CRC Press.
- Barker, E. N., Tasker, S. (2022). Hemotropic Mycoplasma infection. En J. E. Sykes (Ed.), *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat* (5ª ed., pp. 690 - 703). Elsevier.
- 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. E., 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(1–2), 167–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.006>
- Beus, K., Goudarztalejerdi, A., y Sazmand, A. (2024). Molecular detection and identification of hemotropic Mycoplasma species in dogs and their ectoparasites in Iran. *Scientific reports*, 14(1), 580. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51173-w>
- Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B., Alleman, A. R., y Pitulle, C. (2002). Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. *American journal of veterinary research*, 63(10), 1385–1388. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1385>
- Bouzouraa, T., Cadore, J. L., Chene, J., Goy-Thollot, I., Ponce, F., Chalvet-Monfray, K., Rannou, B., y Chabanne, L. (2017). Implication, clinical and biological impact of vector-borne

- haemopathogens in anaemic dogs in France: a prospective study. *The Journal of small animal practice*, 58(9), 510–518. <https://doi.org/10.1111/jsap.12690>
- Brinson, J. J., y Messick, J. B. (2001). Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(12), 1943–1936. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1943>
- Camargo Castillo, M. A., de Almeida, B. A., Wissmann, D., Moreira, R. F., Okano, F. Y., Gonzalez, F. H. D., Soares, J. F., y de Faria Valle, S. (2023). Viability of erythrocytes in canine packed red blood cells stored in CPDA-1 is related to the presence of *Mycoplasma haemocanis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101982>
- Cannon, S. H., Levy, J. K., Kirk, S. K., Crawford, P. C., Leutenegger, C. M., Shuster, J. J., Liu, J., y Chandrashekar, R. (2016). Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 211, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.02.012>
- Clark, R. (1942) Eperythrozoon felis (sp. Nov) in a cat. *Journal of the South African Veterinary Medical Association* 13, 15–16.
- Compton, S. M., Maggi, R. G., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.06.004>
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., y Barba-Carretero, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary microbiology*, 93(4), 307–317. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00044-0)
- da Costa Vieira, R. F., Vidotto, O., Vieira, T. S., Guimaraes, A. M., Santos, A. P., Nascimento, N. C., Santos, N. J., Martins, T. F., Labruna, M. B., Marcondes, M., Biondo, A. W., y Messick, J. B. (2015). MOLECULAR INVESTIGATION OF HEMOTROPIC MYCOPLASMAS IN HUMAN BEINGS, DOGS AND HORSES IN A RURAL SETTLEMENT IN SOUTHERN BRAZIL. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(4), 353–357. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400014>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 8, p. 772). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

- de Faria Valle, S., Messick, J. B., Dos Santos, A. P., Kreutz, L. C., Duda, N. C., Machado, G., Corbellini, L. G., Biondo, A. W., y González, F. H. (2014). Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(4), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.08.001>
- do Nascimento, N. C., Santos, A. P., Guimaraes, A. M., Sanmiguel, P. J., y Messick, J. B. (2012). *Mycoplasma haemocanis*-the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary research*, 43(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-66>
- Do, T., Phoosangwalthong, P., Kamyngkird, K., Kengradomkij, C., Chimnoi, W., y Inpankaew, T. (2021). Molecular detection of tick-borne pathogens in stray dogs and *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato in Ticks from Bangkok, Thailand. *Pathogens*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens10050561>
- Duclos, D. D., Jeffers, J. G., y Shanley, K. J. (1994). Prognosis for treatment of adult-onset demodicosis in dogs: 34 cases (1979-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(4), 616–619
- Gálvez, R., Musella, V., Descalzo, M. A., Montoya, A., Checa, R., Marino, V., Martín, O., Cringoli, G., Rinaldi, L., y Miró, G. (2017). Modelling the current distribution and predicted spread of the flea species *Ctenocephalides felis* infesting outdoor dogs in Spain. *Parasites and vectors*, 10(1), 428. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2357-4>
- García Luccioni, P.M., y Rodríguez López, J.C. (12 de marzo de 2018). *Mycoplasma haemocanis*: reporte de un caso en el País Vasco. Portal Veterinaria. <https://www.portalveterinaria.com/>
- Gretillat, S. (1981). Haemobartonella canis (Kikuth, 1928) in the blood of dogs with parvovirus disease. *Journal of Small Animal Practice*, 22(10), 647–653. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1981.tb00568.x>
- Happi, A. N., Toepp, A. J., Ugwu, C. A., Petersen, C. A., y Sykes, J. E. (2018). Detection and identification of blood-borne infections in dogs in Nigeria using light microscopy and the polymerase chain reaction. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 11, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.12.002>
- Hartig, F. (2020). DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.3.2.0. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>
- Harvey, J.W. (2008). Micoplasmosis hemotrófica (hemobartonelosis). En C.E. Greene (Ed.), *Enfermedades Infecciosas Del Perro y Del Gato* (3ª ed., Vol.2, pp. 282 – 291). Intermedica.

- Hasiri, M. A., Sharifiyazdi, H., y Moradi, T. (2016). Molecular detection and differentiation of canine hemoplasma infections using RFLP-PCR in dogs in southern Iran. *Veterinarski Arhiv*, 86(4), 529-540.
- Hicks, C. A., Barker, E. N., Brady, C., Stokes, C. R., Helps, C. R., y Tasker, S. (2014). Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: new insights into haemoplasma taxonomy. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 23(100), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.001>
- Hii, S. F., Kopp, S. R., Thompson, M. F., O'Leary, C. A., Rees, R. L., y Traub, R. J. (2012). Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. *Australian veterinary journal*, 90(4), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.00898.x>
- Hii, S. F., Traub, R. J., Thompson, M. F., Henning, J., O'Leary, C. A., Burleigh, A., McMahon, S., Rees, R. L., y Kopp, S. R. (2015). Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne diseases in northern Australia. *Australian veterinary journal*, 93(3), 58–66. <https://doi.org/10.1111/avj.12293>
- Hofmann, M., Hodžić, A., Pouliou, N., y Joachim, A. (2019). Vector-borne pathogens affecting shelter dogs in eastern Crete, Greece. *Parasitology research*, 118(5), 1661–1666. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06284-z>
- Huggins, L. G., Baydoun, Z., Mab, R., Khouri, Y., Schunack, B., Traub, R. J., y Colella, V. (2023). Transmission of haemotropic mycoplasma in the absence of arthropod vectors within a closed population of dogs on ectoparasiticides. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37079-z>
- Hulme-Moir, K. L., Barker, E. N., Stonelake, A., Helps, C. R., y Tasker, S. (2010). Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired Mycoplasma haemocanis infection. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 22(4), 582–587. <https://doi.org/10.1177/10406387100220041>
- Inokuma, H., Oyamada, M., 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 461–463. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.085>

- 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., y 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>
- Kemming, G. I., Messick, J. B., Enders, G., Boros, M., Lorenz, B., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Mueller, W., Hahmann-Mueller, A., Messmer, K., y Thein, E. (2004a). *Mycoplasma haemocanis* infection--a kennel disease?. *Comparative medicine*, *54*(4), 404–409.
- Kemming, G., Messick, J. B., Mueller, W., Enders, G., Meisner, F., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Schropp, A., Wojtczyk, C., Packert, K., Messmer, K., y Thein, E. (2004b). Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem - New insight. *European Surgical Research*, *36*(4), 198–205. <https://doi.org/10.1159/000078853>
- Kenny, M. J., Shaw, S. E., Beugnet, F., y Tasker, S. (2004). Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. *Journal of clinical microbiology*, *42*(11), 5397–5399. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5397-5399.2004>
- Kikuth, W. (1928). Über einen neuen Anämieerreger, *Bartonella canis* nov. spec. *Klinische Wochenschrift*, *7*(39), 1729-1730. <https://doi.org/10.1007/BF01738861>
- Kim, J., Lee, D., Yoon, E., Bae, H., Chun, D., Kang, J. G., Jung, D. I., y Yu, D. H. (2020). Clinical Case of a Transfusion-Associated Canine *Mycoplasma haemocanis* Infection in the Republic of Korea: A Case Report. *The Korean journal of parasitology*, *58*(5), 565–569. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.5.565>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lapsina, S., Stirn, M., Novacco, M., Cueni, C., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., & Riond, B. (2023). What is your diagnosis? Hematology and blood smear of a dog. *Veterinary clinical pathology*, *52 Suppl 2*, 93–96. <https://doi.org/10.1111/vcp.13109>
- Lashnits, E., Grant, S., Thomas, B., Quorollo, B., y Breitschwerdt, E. B. (2019). Evidence for vertical transmission of *Mycoplasma haemocanis*, but not *Ehrlichia ewingii*, in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *33*(4), 1747–1752. <https://doi.org/10.1111/jvim.15517>
- Lester, S. J., Hume, J. B., y Phipps, B. (1995). *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, *36*(7), 444–445.

- Messick, J. B. (2003). New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim*, 33, 1453–1465. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00122-0)
- Messick, J. B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. In *Veterinary Clinical Pathology* (Vol. 33, Issue 1, pp. 2–13). American Society for Veterinary Clinical Pathology. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>
- Messick, J. B., Walker, P. G., Raphael, W., Berent, L., y Shi, X. (2002). 'Candidatus mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., 'Candidatus mycoplasma haemolamae' sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotrophic 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(Pt 3), 693–698. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-693>
- Messick, J. B., y Harvey, J. W. (2012). Hemotrophic mycoplasmosis (hemobartonellosis). En C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 310–319). Elsevier Saunders.
- Mierzejewska, E. J., Welc-Falęciak, R., Bednarska, M., Rodo, A., y Bajer, A. (2014). The first evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 21(3), 500–503. <https://doi.org/10.5604/12321966.1120590>
- Millán, J., Velarde, R., Delicado, V., Negre, N., Ribas, A., Oleaga, Á., Llaneza, L., y Esperón, F. (2018). High diversity of hemotropic mycoplasmas in Iberian wild carnivores. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 60, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.007>
- Museux, K., Boretti, F. S., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L. E., Wittenbrink, M. M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C. E., Lutz, H., y Hofmann-Lehmann, R. (2009). In vivo transmission studies of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' in the domestic cat. *Veterinary research*, 40(5), 45. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009028>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (s.f.). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Recuperado de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (s.f.). GenBank Overview. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., y Tully, J. G. (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*'. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 3), 891–899. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-891>
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., y Tully, J. G. (2002). Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 2), 683. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-683>
- Neimark, H., y Kocan, K. M. (1997). The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. *FEMS microbiology letters*, 156(2), 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12742.x>
- Neitz, W. O. (1938). The appearance of *Bartonella muris* (M. Mayer 1921) in the albino and wild rat after splenectomy. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 10(1).
- North, D. C. (1978). Fatal haemobartonellosis in a non-splenectomized dog – a case report. *J Small Anim Pract* 19, 769–773. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1978.tb05571.x>
- Novacco, M., Meli, M. L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M. G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapiço, T., Willi, B., Wolf, 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*, 142(3-4), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.069>
- Nury, C., Blais, M. C., y Arsenault, J. (2021). Risk of transmittable blood-borne pathogens in blood units from blood donor dogs in Canada. *Journal of veterinary internal medicine*, 35(3), 1316–1324. <https://doi.org/10.1111/jvim.16139>
- Obara, H., Fujihara, M., Watanabe, Y., Ono, H. K., y Harasawa, R. (2011). A feline hemoplasma, "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*", detected in dog in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 841-843. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0521>
- Peña López, J. (2019). *Identificación de garrapatas exófilas en el noroeste de España* [Trabajo de fin de grado para optar al título en Veterinaria]. Universidade de Santiago de Compostela.
- Pitorri, F., Dell'Orco, M., Carmichael, N., Barker, E. N., Hollywood, M., y Tasker, S. (2012). Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis*

- infection with doxycycline in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 493–496. <https://doi.org/10.1111/vcp.12002>
- Pryor, W. H., Jr. and R. P. Bradbury. 1975. Haemobartonella canis infection in research dogs. *Lab. Anim. Sci.* 25:566-569
- Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., Rodríguez-Camarillo, S., y Aguilar-Díaz, J. H. (2020). Hemotropic mycoplasmas, occurrence and detection methods in animals of veterinary importance. *Revista de Salud Animal*, 42(1).
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ravagnan, S., Carli, E., Piseddu, E., da Rold, G., Porcellato, E., Zanardello, C., Carminato, A., Vascellari, M., y Capelli, G. (2017). Prevalence and molecular characterization of canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy. *Parasites and Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2069-9>
- Rikihisa, Y., Kawahara, M., Wen, B., Kociba, G., Fuerst, P., Kawamori, F., Suto, C., Shibata, S., y Futohashi, M. (1997). Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *Journal of clinical microbiology*, 35(4), 823–829. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.823-829.1997>
- Roblejo-Arias, L., Díaz-Sánchez, A. A., Corona-González, B., Meli, M. L., Fonseca-Rodríguez, O., Rodríguez-Mirabal, E., Marrero-Perera, R., Vega-Cañizares, E., Lobo-Rivero, E., y Hofmann-Lehmann, R. (2022). First molecular evidence of *Mycoplasma haemocanis* and 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum' infections and its association with epidemiological factors in dogs from Cuba. *Acta tropica*, 228, 106320. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106320>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., y Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M. D., Barker, E. N., Planellas, M., Helps, C. R., Francino, O., Shaw, S. E., y Tasker, S. (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 22(2), 270–274. <https://doi.org/10.1177/104063871002200219>

- Sasaki, M., Ohta, K., Matsuu, A., Hirata, H., Ikadai, H., y Oyamada, T. (2008). A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. *The Journal of Protozoology Research*, 18, 57–60. <http://id.nii.ac.jp/1588/00001462/>
- Seneviratna, P., Weerasinghe, y Ariyadasa, S. (1973). Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Research in veterinary science*, 14(1), 112–114.
- Sharifiyazdi, H., Abbaszadeh Hasiri, M. Radmanesh, M. Development of RFLP-PCR and simple multiplex PCR assays for detection and differentiation of two species of hemotropic mycoplasmas in naturally infected dogs, *Comp. Clin. Path.* 25 (2016) 847–853, <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-016-2272-7>
- 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.
- Soares, R. L., Echeverria, J. T., Pazzuti, G., Cleveland, H. P., Babo-Terra, V. J., Friozi, E., y Ramos, C. A. (2016). Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 25(3), 360–363. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016043>
- Soto, F., Walker, R., Sepulveda, M., Bittencourt, P., Acosta-Jamett, G., y Müller, A. (2017). Occurrence of canine hemotropic mycoplasmas in domestic dogs from urban and rural areas of the Valdivia Province, southern Chile. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.013>
- Suh, G. H., Ahn, K. S., Ahn, J. H., Kim, H. J., Leutenegger, C., y Shin, S. (2017). Serological and molecular prevalence of canine vector-borne diseases (CVBDs) in Korea. *Parasites and vectors*, 10(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2076-x>
- Sykes, J. E., Ball, L. M., Bailiff, N. L., y Fry, M. M. (2005). '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 1), 27–30. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02989-0>
- Sykes, J.E. and Tasker, S. (2014). Hemoplasma Infections. En Sykes, J. E. (Ed.) *Canine and Feline Infectious Diseases* (pp. 390 - 398). Elsevier Saunders.
- Tasker, S. (2020). Hemotropic *Mycoplasma*. En D.S. Bruyette (Ed.), *Clinical small animal internal medicine* (pp. 927 - 930). Wiley-Blackwell.

- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Harbour, D. A., Shaw, S. E., Harrus, S., Baneth, G., Lobetti, R. G., Malik, R., Beauvils, J. P., Belford, C. R., y Gruffydd-Jones, T. J. (2003). Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3877–3880. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3877-3880.2003>
- Varanat, M., Maggi, R. G., Linder, K. E., y Breitschwerdt, E. B. (2011). Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* pp. in dogs with splenic disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(6), 1284–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00811.x>
- Venable, J. H., y Ewing, S. A. (1968). Fine - structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales: Bartonellaceae) and its relation to the host erythrocyte. *The Journal of parasitology*, 54(2), 259–268.
- Warman, S. M., Helps, C. R., Barker, E. N., Day, S., Sturgess, K., Day, M. J., y Tasker, S. (2010). Haemoplasma infection is not a common cause of canine immune-mediated haemolytic anaemia in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 51(10), 534–539. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00987.x>
- 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(1–3), 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.018>
- 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. *Veterinary microbiology*, 125 (3-4), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.027>
- Willi, B., Meli, M. L., Lüthy, R., Honegger, H., Wengi, N., Hoelzle, L. E., Reusch, C. E., Lutz, H., y Hofmann-Lehmann, R. (2009). Development and application of a universal Hemoplasma screening assay based on the SYBR green PCR principle. *Journal of clinical microbiology*, 47(12), 4049–4054. <https://doi.org/10.1128/JCM.01478-09>
- 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. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 152(5), 237–244. <https://doi.org/10.1024/0036-7281/a000055>
- 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. *American journal of veterinary research*, 66(6), 1008–1012. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1008>

Wright I. G. (1971). The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomised dog. *Australian veterinary journal*, 47(4), 157–159. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1971.tb02126.x>

Zhou, X., Hohman, A. E., y Hsu, W. H. (2022). Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 45(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jvp.12959>

Zhuang, Q. J., Zhang, H. J., Lin, R. Q., Sun, M. F., Liang, X. J., Qin, X. W., Pu, W. J., y Zhu, X. Q. (2009). The occurrence of the feline “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4), 689–692. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9242-2>

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. In *Acta Veterinaria* (Vol. 70, Issue 2, pp. 277–284). Sciendo. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0020>