

Detección molecular de *Anaplasma platys* a partir de sangre capilar canina en papel filtro

Molecular detection of *Anaplasma platys* from canine capillary blood dog filter paper

Alba María Araujo Oviedo^{1*}, Selva Lucía Amarilla², Jeanette María Irene Filippi Dallmann¹, María de Lourdes Quiñónez Narváez¹, Lino César Ramírez Ayala³, Guillermo Giménez Bareiro¹, Ingrid Paloma Florentín Ibarra¹, María Inés Rodríguez Acosta¹, Olga Lorena Núñez Yegros^{1*}

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Veterinarias. San Lorenzo, Paraguay.

²Centro Estético y Veterinario Jerry Dog. Asunción, Paraguay.

³Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA). Programa de Genética y Mejora Animal. Cataluña, España.



*Autor correspondiente:

aaaraujo@vet.una.py
lnunez@vet.una.py

Editora jefe:

Griselda A. Meza Ocampos^{ie}, Universidad Nacional de Asunción (UNA). Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). San Lorenzo, Paraguay.

Co-editora:

Juliana Moura Mendes Arrúa^{ie}, Universidad Nacional de Asunción (UNA). Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). San Lorenzo, Paraguay.

Recibido:

04 de marzo de 2025

Revisado:

27 de marzo de 2025

Aceptado:

13 de julio de 2025

Recibido en versión modificada:

27 de julio de 2025

Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons

“CC BY 4.0”.

Declaración de conflicto: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

e-ISSN 2709-0817

Como citar: Araujo Oviedo, A. M., Amarilla, S. L., Filippi Dallmann, J., Quiñónez Narváez, M. L., Ramírez Ayala, L. C., Giménez Bareiro, G., Florentín Ibarra, I. P., Rodríguez Acosta, M. L., & Núñez Yegros, O. L. (2026). Detección molecular de *Anaplasma platys* a partir de sangre capilar canina en Papel Filtro. *Revista investigaciones y estudios – UNA*, 16(2), pp. 65-76.

Resumen. Debido a la alta prevalencia de *Anaplasma platys* en zonas tropicales, el presente estudio evaluó la utilidad del papel filtro impregnado con sangre capilar canina como método alternativo para la detección molecular de *A. platys*. Se analizaron 101 muestras de ADN genómico extraídas de sangre seca impregnada en papel filtro modificado. La extracción de ADN se realizó mediante resinas de intercambio iónico (Chelex 100®) y se amplificó un fragmento del gen *p44* mediante cPCR. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Los resultados mostraron que 9 de 101 muestras (8,91%) fueron positivas para *A. platys*, evidenciando la presencia del hemopatógeno en la población canina analizada. Los hallazgos del estudio respaldan el uso del papel filtro impregnado con sangre capilar como una alternativa confiable y eficiente para la recolección, transporte y almacenamiento de muestras sanguíneas en el diagnóstico molecular de *A. platys*, contribuyendo así a la vigilancia epidemiológica y al manejo clínico de esta infección en poblaciones caninas.

Palabras clave: *Anaplasma platys*, hemopatógeno, papel filtro, cPCR, perro

Abstract. Due to the high prevalence of *Anaplasma platys* in tropical areas, the present study evaluated the usefulness of filter paper impregnated with canine capillary blood as an alternative method for the molecular detection of *A. platys*. A total of 101 genomic DNA samples extracted from dried blood impregnated on modified filter paper were analyzed. DNA extraction was performed using ion-exchange resins (Chelex 100®), and a fragment of the *p44* gene was amplified by conventional PCR (cPCR). Amplification products were visualized by 1.5% agarose gel electrophoresis. The results showed that 9 out of 101 samples (8.91%) tested positive for *A. platys*, demonstrating the presence of the hemopathogen in the analyzed canine population. The study findings support the use of filter paper impregnated with capillary blood as a reliable and efficient alternative for the collection, transport, and storage of blood samples in the molecular diagnosis of *A. platys*, thus contributing to epidemiological surveillance and clinical management of this infection in canine populations.

Keywords: *Anaplasma platys*, hemopathogen, filter paper, cPCR, dog

Introducción

Anaplasma platys es una bacteria morular Gram negativa presente en regiones tropicales y subtropicales, específica de las plaquetas, que infecta al perro a través de un vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l), de distribución mundial. Es uno de los hemopatógenos cosmopolita con mayor prevalencia en caninos, en quienes desencadena una trombocitopenia de comportamiento cíclico y recurrente, cursando de modo semejante a otras patologías febriles o en muchos casos, comportándose de manera asintomática, ocasiones en las cuales los diagnósticos erróneos o indefinidos son frecuentes (de la Fuente et al., 2006; Páez-Triana et al., 2021; Pérez-Macchi et al., 2019).

El diagnóstico del agente incluye cultivo, serología y observación de inclusiones plaquetarias en frotis o extendidos de sangre siendo esta última, la técnica más comúnmente utilizada en la detección del mismo; sin embargo, su observación e interpretación dependen del operador, lo que conlleva muchas veces a errores en la identificación del patógeno (Dantas-Torres, 2008; Silaghi et al., 2017).

Por lo expuesto, es necesario recurrir a técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (cPCR) que ofrece mayor especificidad (importante ventaja en el diagnóstico y monitoreo de patologías infecciosas) y sensibilidad (valiosa por sobre todo en enfermedades asociadas con cargas bajas del agente en sangre) permitiendo la detección de ADN del patógeno incluso en individuos asintomáticos (Landázuri Rafael et al., 2021; Martínez et al., 2015; McCabe, 1991).

En cuanto al tipo de muestra, es la sangre el material biológico de preferencia en el diagnóstico y considerando la capacidad de afectar células sanguíneas que le caracteriza al género *Anaplasma* sp. y la extracción del material genético a partir de ella relacionada a su vez de manera estrecha con pasos previos a la obtención de ADN ineludibles (colecta, transporte y almacenamiento) es fundamental garantizar la integridad del material genético patógeno, hasta su obtención. Sin embargo, las condiciones no siempre son favorables pudiendo ocurrir situaciones que complican muchas veces el acceso a una buena muestra de sangre interfiriendo en las condiciones que la técnica molecular exige y comprometiendo a su vez, la validez de la muestra sanguínea en el análisis molecular (Landázuri Rafael et al., 2021; Singh et al., 2018).

En referencia a la situación mencionada, la obtención de un mínimo volumen de sangre entera impregnada en papel filtro ofrece un método conveniente para recolectar, transportar y almacenar muestras sanguíneas facilitando el diagnóstico al permitir la detección de ADN patógeno circulante, con antecedentes previos reportados en el desarrollo y difusión de diferentes programas que involucran a pruebas de detección diagnóstica en recién nacidos, determinación de frecuencias alélicas mutantes en diversas poblaciones, identificación forense, base de datos y diagnóstico, entre otros en medicina humana sumados a la utilidad demostrada en el sexado de aves, genotipificación en animales de laboratorio y otras determinaciones llevadas a cabo en áreas que competen al campo veterinario (del Puerto et al., 2017; McCabe, L. L., & McCabe, E. R. B., 2002; Núñez et al., 2018; Simon et al., 2020; Singh et al., 2018; Smit et al., 2014).

Las dificultades pues, inherentes a los métodos tradicionales de obtención de muestras en humanos, son extrapolables al ámbito veterinario donde un mínimo volumen de sangre dispuesto en papel filtro, resultaría suficiente para paliar varios de los inconvenientes frecuentes en el trabajo cotidiano permitiendo el diagnóstico de diversos hemopatógenos, entre ellos *A. platys* (Smit et al., 2014).

Es oportuno destacar que, el presente estudio es el primero en el cual se emplea la técnica de extracción de ADN a partir de sangre capilar canina depositada en papel filtro para el diagnóstico de *A. platys*, en Paraguay.

Considerando los antecedentes expuestos, se planteó que el uso del papel filtro impregnado con un mínimo volumen de sangre resultaría suficiente para la detección eficiente de *A. platys* mediante cPCR siendo propuestos los siguientes objetivos, demostrar la utilidad del papel filtro impregnado con sangre capilar canina para la detección molecular de *A. platys*, detectar y caracterizar molecularmente a *A. platys*.

Materiales y Métodos

Toma de muestras biológicas

Se utilizaron 101 muestras de ADN genómico (ADNg) extraídas a partir de gotas secas de sangre capilar pertenecientes a animales de la especie canina, sin distinción de sexo, raza ni edad, impregnadas en papel filtro modificado. Las muestras fueron seleccionadas al azar y forman parte del banco de ADN de la División Laboratorio de Biotecnología Animal dependiente del Departamento Clínicas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Protocolo de extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó mediante resinas de intercambio iónico (Chelex 100[®]) siguiendo la técnica para muestras en papel filtro descrita por del Puerto et al. (2017). Brevemente, las gotas de sangre secas impregnadas en papel filtro, fueron recortadas e introducidas en microtubos estériles de 1,5 mL conteniendo 1 mL de agua bidestilada; se dejó en reposo durante 10 min a temperatura ambiente, centrifugándose luego a 13000 rpm durante 3 min (Benchmark Scientific, modelo MC-12), descartándose el sobrenadante y adicionando 150 µL de Chelex 100[®] al 5%; se incubó a 56°C durante 30 min. Posteriormente, se procedió a la agitación con vortex durante 10 s para luego hervir durante 10 min, repetir el vortexeo y centrifugación a 14000 rpm durante 10 s y 3 min respectivamente. Finalmente, el sobrenadante conteniendo el ADN, estuvo listo como plantilla para su análisis por cPCR, almacenándose a -20°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (cPCR)

La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 12,5 µL de Gotaq[®] Green Master Mix (Promega[®], Madison, USA); 600 nM de cada cebador; agua libre de nucleasas (Thermo Scientific[®], USA) y 5 µL de ADN molde. Siendo sometido a cPCR (BIO-RAD, modelo C1000) un volumen final de 25 µL de mezcla de reacción a fin de amplificar un segmento del gen *p44* de *A. platys* de acuerdo al protocolo ya descrito por Breitschwerdt et al. (2014).

Todos los reactivos se manipularon en condiciones de flujo laminar, utilizando puntas con filtros (Eppendorf[®]; BioPointe Scientific, Mettler Toledo Rainin, EE.UU.). Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 95°C

durante 3 min, seguido de 55 ciclos de 94°C durante 15 s, 70°C durante 15 s y 72°C durante 30 s, completándose la amplificación con una extensión final de 72°C durante 1 min (Breitschwerdt et al., 2014; Pérez-Macchi et al., 2019).

Electroforesis

Tras concluir la amplificación, 5 µL del producto obtenido, fue sometido a electroforesis en cámara y fuente (BIO-RAD, modelo V500/150) a 90V durante 40 min en gel de agarosa (SeaKem®LE Agarose, Lonza) al 1,5% teñido con bromuro de etidio (agente intercalante). Finalmente, se observaron los geles en un transiluminador (JY-025 UV Transluminator) con luz ultravioleta.

Es oportuno indicar que la extracción de ADN, la amplificación por cPCR y la electroforesis fueron llevadas a cabo en tres salas distintas a fin de evitar la contaminación cruzada.

Caracterización molecular y Análisis filogenético

Para la caracterización molecular y posterior análisis filogenético fueron seleccionadas al azar dos muestras que resultaron positivas a la amplificación de una región del gen *p44* (520 pb) de *A. platys* y enviadas a Macrogen® (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación correspondiente.

La secuencia de consenso en formato FASTA se comparó mediante la herramienta de búsqueda de alineación local (BLASTn) con secuencias homólogas disponibles en la base de datos GenBank, a fin de identificar secuencias relacionadas.

El análisis filogenético se realizó mediante el método del vecino más cercano utilizando el modelo de p-distancia en el software MEGA 11. La estabilidad del árbol filogenético se estimó mediante un análisis bootstrap con 1000 réplicas (Kumar et al., 2018).

Análisis de Datos

Los resultados obtenidos por cPCR fueron asentados en una hoja de cálculo Excel y sometidos a análisis de frecuencias y prueba de Chi al cuadrado (χ^2) empleando el software R (paquete InfoStat, versión estudiantil). Las variables estudiadas fueron sexo, rango etario y raza. Se consideró un valor $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Fueron procesadas un total de 101 muestras de ADN procedentes de perros sin distinción de sexo, edad y raza.

Considerando la variable sexo de los animales cuyas muestras de sangre en papel filtro se analizaron por cPCR, 59/101 (58,4%) fueron hembras y 42/101 (41,6%) machos, resultando positivo a *A. platys* 6/59 (10,2%) hembras y 3/42 (7,1%) machos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de frecuencia en muestras clasificadas por sexo para la detección de *Anaplasma platys* en caninos.

RESULTADO			
Sexo	Positivo	Negativo	Total
Hembra	6	53	59
Macho	3	39	42
Total	9	92	101
FR	9%	91%	100%

La Tabla 1 muestra que, la frecuencia de detección de *A. platys* resultó levemente mayor en hembras (10,2%) que en machos (7,1%). Sin embargo, la diferencia no parece ser considerable, lo que sugiere que el sexo no tuvo una influencia significativa en la presencia de la infección en esta muestra poblacional.

Tras evaluar los resultados obtenidos a partir de las muestras de sangre impregnadas en papel filtro, para la detección de *A. platys* por cPCR, no se observaron diferencias significativas empleando la prueba de χ^2 , resultando un valor de $p=0,5947$, lo que corresponde a un mayor nivel de significancia estadística ($p>0,05$).

En cuanto a la edad de los perros cuyas muestras fueron estudiadas, se clasificó en categorías etarias descriptas por quien agrupó las edades en: cachorro (0 a 6 meses); juvenil (6 a 12 meses); adulto joven (12 a 24 meses); adulto maduro (2 a 6 años); senior (7 a 11 años) y geriátrico (12 y más años).

Según el rango etario establecido por Harvey (2021), de los animales estudiados resultaron positivos 1/7 (14,3%) de los cachorros; 1/11 (9%) de los perros juveniles; 5/39 (12,8%) de los perros adultos maduros en tanto que de los animales con mayor edad 1/21 (4,8%) de los perros senior y 1/7 (14,3%) de los gerontes, fueron positivos en tanto que, de las 16 muestras obtenidas de perros adultos jóvenes todos resultaron negativos a la presencia del hemopatógeno (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de frecuencia en muestras clasificadas por categoría etaria para la detección de *Anaplasma platys* en caninos.

Edad	Categoría etaria	RESULTADO		
		Positivo	Negativo	Total
0 a 6 meses	Cachorro	1	6	7
6 a 12 meses	Juvenil	1	10	11
12 a 24 meses	Adulto joven	0	16	16
2 a 6 años	Adulto maduro	5	34	39
7 a 11 años	Senior	1	20	21
12 años y más	Geriátrico	1	6	7
Total		9	92	101

Los resultados de la Tabla 2 sugieren una distribución heterogénea de la infección entre las distintas edades, sin un patrón claramente definido, aunque podrían indicar una mayor susceptibilidad en extremos etarios (muy jóvenes o muy mayores) y en adultos de mediana edad.

Considerando los resultados obtenidos a partir de las muestras de sangre impregnadas en papel filtro para la detección de *A. platys* por cPCR no se observaron diferencias significativas con la prueba de χ^2 , resultando un valor de $p=0,4668$, que corresponde a un mayor nivel de significancia estadística ($p>0,05$).

Con respecto a las razas de los perros, cuyas muestras fueron analizadas en este estudio, se registró un total de 18, de las cuales en 3 razas diferentes se observó presencia del hemopatógeno (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de frecuencia en muestras clasificadas por raza para la detección de *Anaplasma platys* en caninos.

Raza	RESULTADOS		
	Positivos	Negativos	Total
Chow chow	0	4	4
Mestiza	7	52	59
Cócker spaniel	0	2	2
Pomerania	0	1	1
Pinscher	0	1	1
Caniche	0	11	11
Pastor Alemán	0	5	5
Border collie	0	1	1
Labrador retriever	1	2	3
Teckel	0	2	2
Weimaraner	0	1	1
Bóxer	0	2	2
Maltés	0	1	1
Husky siberiano	0	1	1
Pitbull	0	1	1
Bulldog francés	0	4	4
Yorkshire	0	1	1
Golden retriever	1	0	1
Total	9	0	1

De acuerdo a la Tabla 3, fueron los perros de raza mestiza quienes presentaron la mayoría de los casos positivos, lo cual podría deberse a la alta frecuencia de animales mestizos en la muestra total. No se evidenció una tendencia clara de predisposición racial con los datos obtenidos.

El 77,8% de los animales cuyas muestras fueron positivas eran de raza mestiza en tanto que, las dos razas Labrador retriever y Golden retriever presentaron mismo número de ejemplares infectados correspondiendo al 11,1% de positividad para cada una de las razas.

En lo que refiere a las reacciones de cPCR propiamente dicha, la observación de una banda de 520 pares de bases (pb), se consideró como resultado positivo a la presencia de un segmento del gen *p44* de *A. platys*, siendo identificadas tales bandas en 9/101 productos de amplificación analizados, lo cual representa 8,91% de muestras positivas a la presencia del hemopatógeno en estudio. No se observó amplificación a nivel de los controles negativos (Figura 1).

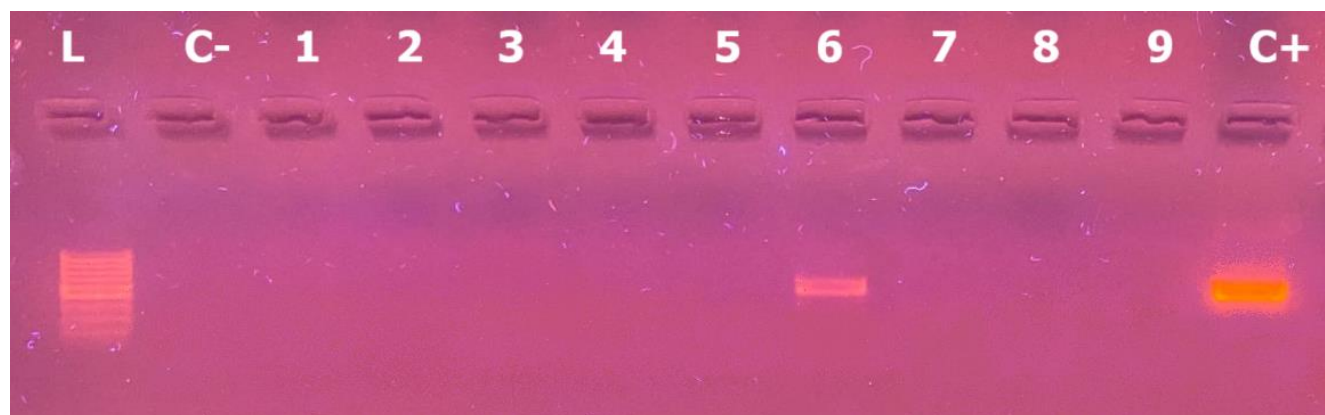


Figura 1. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de productos de amplificación de la cPCR, utilizando cebadores del gen *p44* específicos para *A. platys*. L: marcador de peso molecular de 100 pb; C-: control negativo; pocillo 6: muestra positiva a *A. platys*; C+: control positivo que corresponde a un tamaño de 520 pb.

La imagen en detalle, muestra el patrón de migración electroforética característico de la reacción, donde se observa la banda de 520 pb correspondiente al tamaño esperado para el gen *p44* del hemopatógeno en estudio. La disposición de los carriles en el gel de agarosa al 1,5% permite apreciar la separación definida del amplicón analizado al ser comparado con las bandas de referencia del marcador de peso molecular empleado. Por último, en el carril del control negativo no se observa señal fluorescente ni bandas inespecíficas, con lo que se demuestra la ausencia de contaminación en el ensayo.

Secuenciación y Análisis Filogenético

La secuenciación y el análisis filogenético fueron llevados a cabo en 2/9 muestras positivas seleccionadas (22,2%) para el gen *p44* de *A. platys*. Las secuencias en estudio identificadas como (*Anaplasma platys* Paraguay 01 y *Anaplasma platys* Paraguay 02 con número de acceso de GenBank PQ788297 y PQ788298 respectivamente) mostraron 100% de identidad entre sí, evidenciando relación muy cercana con tres secuencias de *Anaplasma platys* de Paraguay previamente registradas (MG679911, MG679910 y MG679908), compartiendo con tales secuencias un alto grado de identidad, como se observa en la Figura 2.

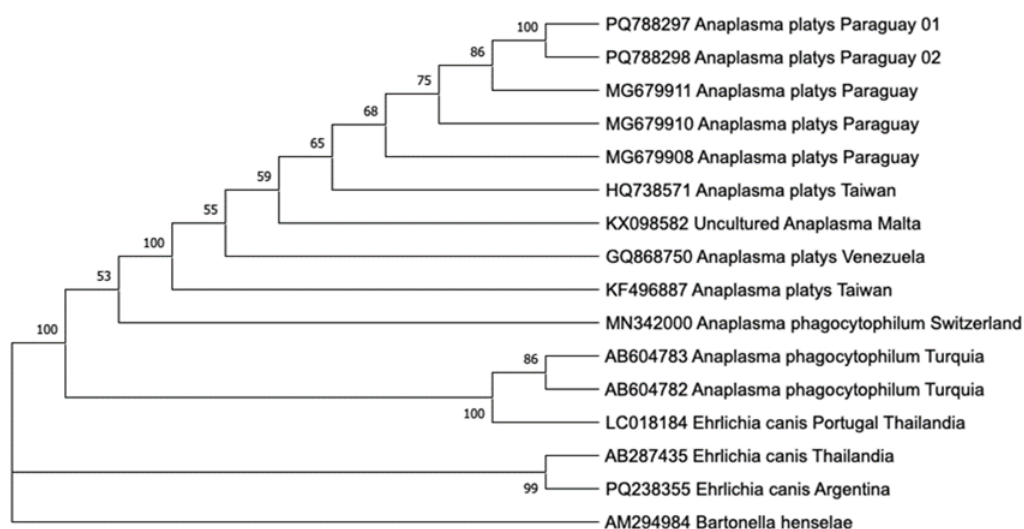


Figura 2. Árbol filogenético inferido empleando el método del vecino más cercano. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap superiores al 50% obtenidos con 1000 réplicas.

Muy cercanas también a las secuencias analizadas, se encuentran secuencias reportadas previamente provenientes de Taiwán (HQ738571), Malta (KX098582), Venezuela (GQ868750) y otra secuencia *A. platys* procedente también de Taiwán (KF496887), todas agrupadas con valores bootstrap elevados.

Además, se incluyó una secuencia de *Bartonella henselae* (AM294984) como outgroup, que se situó como grupo externo bien separado de los otros géneros analizados en el árbol.

Discusión

Los resultados positivos y la confirmación posterior de la presencia de *A. platys* obtenidos en el presente estudio, avalan la utilidad y eficacia del empleo del papel filtro conteniendo gotas de sangre como material biológico, para el diagnóstico de este patógeno. Tal como se evidencia en estudios previos y lo han mencionado entre otros, el papel filtro no es novedad en el diagnóstico, pues ha sido ya empleado en la colecta rutinaria de muestras de sangre y capa leucocítica en la detección de diferentes patógenos sanguíneos y otras varias mediciones en el campo que involucra a salud humana (Ahmed et al., 2011; McCabe, L. L., & McCabe, E. R. B., 2002; Smit et al., 2014).

En veterinaria, también se lo describe relacionado al diagnóstico de enfermedades y otras determinaciones en ganado y vida silvestre, sin embargo, no es muy mencionado en el campo que incumbe al diagnóstico en animales de compañía o mascotas convencionales, donde su uso resultaría también sumamente útil al proporcionar al operador facilidades respecto al manejo de especímenes biológicos hasta su procesamiento (del Puerto et al., 2017; Núñez et al., 2018; Smit et al., 2014).

Tal como mencionan Núñez Yegros et al. (2025), la amplificación del material genético de *Anaplasma* spp. mediante técnicas moleculares como la cPCR, tiene ventajas claras sobre otros métodos, ya que el microorganismo puede ser difícil de detectar mediante técnicas convencionales como las observaciones microscópicas cuando los niveles de parasitemia son bajos. Esto se debe a que las técnicas tradicionales mediante extendidos de sangre disminuyen drásticamente o pierden directamente eficacia diagnóstica cuando la carga del hemopatógeno es mínima.

Por consiguiente, el empleo de técnicas moleculares como la cPCR supera ampliamente las limitaciones de la observación microscópica directa incluso cuando la carga de microorganismos es baja o indetectable y se torna una herramienta diagnóstica de relevancia al permitir identificar infecciones en fases tempranas además de portadores crónicos.

La colecta de sangre en papel filtro constituye una metodología sencilla y de bajo costo que permite optimizar tanto la conservación como el transporte de las muestras sanguíneas; este procedimiento favorece el manejo de las muestras biológicas al facilitar su preservación durante periodos prolongados, manteniendo sus características adecuadas para análisis laboratoriales posteriores, asimismo, simplifica tareas relacionadas con el almacenamiento y traslado de los fluidos biológicos desde el lugar de muestreo hasta el laboratorio, contribuyendo a una logística más práctica y eficiente para su procesamiento y estudio. (Cardoso et al., 2010)

Como refiere Simon et al. (2020) una amplia variedad de diferentes papeles de filtro se encuentran disponibles en el mercado, tales como Whatman Grado 3, S&S 903 y el papel FTA[®] diseñado específicamente para la preservación

de ácidos nucleicos muy utilizado en el almacenamiento y transporte de sangre para diagnóstico molecular de agentes patógenos sin embargo, al ser papeles sometidos a tratamientos especiales tienen como importante desventaja el costo que implica su adquisición en tanto que el papel filtro modificado o común no resulta costoso e incorporarlo como un insumo más en el laboratorio tiene sus ventajas a pesar de no ser recomendable para el almacenamiento a muy largo plazo considerando que no protegen la muestra contra el deterioro y la degradación como sí lo hacen aquellos papeles tratados. Además, el uso del reactivo Chelex® 100 en la extracción de ADN genómico a partir de diversos tipos de muestras biológicas ha demostrado ser una alternativa válida y ampliamente utilizada en contextos de investigación y diagnóstico, destacándose no solo por su bajo costo en comparación con los kits de extracción comercial, sino también por las ventajas que ofrece en lo que respecta a rapidez y simplicidad operativa. En estudios comparativos, se ha evidenciado que el protocolo basado en Chelex® permite la obtención de ADN utilizando menos reactivos y materiales, lo cual resulta beneficioso en entornos con recursos limitados o donde se requiere el procesamiento simultáneo de múltiples muestras (Ahmed et al., 2011; Auricchio et al., 2013; McCabe et al., 2002; Smit et al., 2014).

Por otra parte, teniendo en cuenta el volumen de sangre que resultó suficiente en el procesamiento y análisis, Singh et al. (2018) han demostrado que cantidades mínimas de muestras de sangre, como una fracción de 5µL dispuesta en un disco de papel filtro de 8 mm de diámetro, produce suficiente ADN genómico para múltiples reacciones de PCR. Esto resulta relevante pues un inconveniente importante, común para la mayoría de los métodos de extracción de ADN, es la necesidad de disponer una considerable cantidad de muestra biológica, dificultad que sería superada al colectar gotas de sangre en papel filtro.

En cuanto a calidad de muestra refiere, se considera punto crítico también en los análisis empleando técnicas moleculares como la cPCR, la remisión al laboratorio de muestras de sangre entera alterada, es decir hemolizada y/o con presencia de coágulos. Al respecto, y como refiere Landázuri Rafael et al. (2021) muestras de sangre hemolizada y coagulada, son descartadas como material biológico para las pruebas de detección molecular pues al ser la sangre con hemólisis más concentrada en hemoglobina y sus derivados al igual que los coágulos, dificulta la lisis celular y consecuente liberación del material genético que finalmente comprometen la eficacia diagnóstica de la PCR.

Tal situación implica que el profesional veterinario deba repetir la toma de muestras que significa pérdida de tiempo e insumos. Este contratiempo también tendría solución al adoptar el uso del papel filtro, pues por las características de la muestra biológica remitida impregnada sobre él, sería optimizada la remisión, iniciando la extracción sin pérdida de material.

Como se ha venido mencionando son varias las ventajas que un operador aprovecharía al incluir papel filtro en el trabajo cotidiano sin olvidar mencionar que, al transportar gotas de sangre impregnadas en él, no se necesita cadena de frío para la preservación del material biológico desde su colecta hasta la remisión al laboratorio para su procesamiento (Smit et al., 2014).

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo en lo que refiere al sexo, raza y edad considerando la frecuencia de casos positivos para el hemopatógeno en estudio, fueron similares a los obtenidos por De Menezes Silveira et al. (2019) quienes afirmaron que la susceptibilidad a infecciones hemopatógenas (entre

ellas la afección por *A. platys*) es igual para todos los animales, independientemente al sexo, raza y edad. Así también análisis llevados a cabo por Ayala Mendoza et al. (2024) fueron concluyentes respecto a tales variables biológicas (edad, raza, sexo) afirmando que no constituyen factores determinantes para la infección por hemoparásitos ni de sus vectores (garrapatas) en caninos.

Finalmente, con los resultados de secuenciación se confirma la eficacia de la cPCR en la detección del hemopatógeno utilizando sangre impregnada en papel filtro. Además, se reafirma la circulación instalada de *A. platys* en los caninos paraguayos, cuya prevalencia de infección fue reportada años atrás igual a 10,67% por Pérez-Macchi et al. (2019) a partir de un estudio que involucró 384 perros provenientes del área metropolitana de Asunción – Paraguay, con lo cual es más que acertado considerar al patógeno estudiado como uno de los agentes infecciosos que actualmente afecta a la población canina y se considera más que oportuno el diagnóstico molecular en tiempo y forma siendo escasas gotas de sangre dispuestas en papel filtro común, suficientes para ello.

Conclusiones

Avalados por los resultados obtenidos en la detección de *A. platys* por cPCR a partir de ADN extraído de un mínimo volumen de sangre capilar canina, depositado en forma de gotas impregnadas en papel filtro modificado o común, se demuestra la utilidad del empleo del mismo en la colecta de rutina como elemento estratégico práctico y de fácil manejo para el operador.

De este modo, es posible paliar dificultades de importancia, que se presentan con frecuencia desde la colecta, seguidos por el transporte y el almacenamiento de muestras de sangre que generan verdaderos contratiempos, más acentuados todavía cuando sumado a condiciones de trabajo desfavorables, los sitios de muestreo se ubican geográficamente distantes de los laboratorios donde se procesa el material biológico colectado.

Finalmente, es pertinente afirmar que la implementación del papel filtro como herramienta rutinaria no solo optimiza recursos, sino que también permite la expansión de las posibilidades de monitoreo de vigilancia epidemiológica en escenarios de limitada infraestructura.

Contribución de autores: A.M.A.O; O.L.N.Y **Conceptualización:** A.M.A.O; O.L.N.Y **Curación de datos:** A.M.A.O; O.L.N.Y; M.L.N.Q **Análisis formal:** M.I.R.A; L.C.R.A; A.M.A.O; O.L.N.Y **Adquisición de fondos:** G.G.B **Investigación:** A.M.A.O; O.L.N.Y; I.P.F.I **Metodología:** A.M.A.O; O.L.N.Y; S.L.A; J.M.I.F.D **Administración del Proyecto:** G.G.B **Recursos:** G.G.B; O.L.N.Y; A.M.A.O **Software:** L.C.R.A; M. I. R. A; M.L.N.Q **Supervisión:** O.L.N.Y **Validación:** A.M.A.O; O.L.N.Y **Visualización:** L.C.R.A **Redacción-borrador original:** A.M.A.O; O.L.N.Y **Redacción-revisión y edición:** A.M.A.O; O.L.N.Y; I.P.F.I

Fuente de Financiamiento: sin fuente de financiamiento

Disponibilidad de datos: los datos utilizados en esta investigación podrán ser solicitados al autor de correspondencia según pertinencia. Correos: aaraujo@vet.una.py ; lnunez@vet.una.py

Revisión por pares: Este artículo fue evaluado mediante un proceso de revisión por pares doble ciego.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed, H. A., MacLeod, E. T., Hide, G., Welburn, S. C., & Picozzi, K. (2011). The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasites & Vectors*, 4, 68. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-68>
- Auricchio, B., Anniballi, F., Fiore, A., Skiby, J.E., De Medici, D. (2013). Evaluation of DNA extraction methods suitable for PCR-based detection and genotyping of *Clostridium botulinum*. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*, 11(S1), S200–S206. <https://doi.org/10.1089/bsp.2012.0082>
- Ayala Mendoza, C. A., Arzamendia de Rodríguez, M. C. & Torales Alvarenga, L. L. (2024). Identificación de *Rickettsias* sp. y hemoparásitos en garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* en perros de la ciudad de San Juan Bautista, departamento de Misiones, Paraguay. *Revista investigaciones y estudios – UNA*, 15(1), 27-37. <https://doi.org/10.57201/ieuna2413371?>
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Quorllo, B. A., Saito, T. B., Maggi, R. G., Blanton, L. S., & Bouyer, D. H. (2014). Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasites & Vectors*, 7, 298. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2010). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *The Veterinary Journal*, 183(2), 232–233. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.10.009>
- Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>
- De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., & Kocan, K. M. (2006). Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-24>
- De Menezes Silveira, A., Menezes, G. M. M., Torquato Júnior, A. da S., Santos, A. L. da C., & Delfino, A. I. S. A. (2019). Survey of hemoparasitosis in dogs and cats at Dr. Vicente Borelli Veterinary Hospital - Aracaju - Sergipe. *Pubvet Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 13(1), 1–5. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n01a260.1-5>
- Del Puerto, F., Pésole, D., Molina, S., Vera, K., Arias, M., Sosa, Ortiz, M. L., Fernández, J., & Garay, A. (2017). Identificación molecular del sexo en 9 especies de aves del Centro de Investigación en Animales Silvestres de la hidroeléctrica de ITAIPU, lado paraguayo. *Memorias Del Instituto De Investigaciones En Ciencias De La Salud*, 15(3), 89-92. <https://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/1939>
- Harvey, N. D. (2021). How old is my dog? Identification of rational age groupings in pet dogs based upon normative age-linked processes. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 643085. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643085>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & 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>
- Landázuri Rafael, T. H., Carrasco, A., León, R., Vinuesa, L., & Barragán, V. (2021). Optimización de un protocolo de extracción de ADN a partir de sangre bovina hemolizada y coagulada para la detección molecular de *Anaplasma* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(2), 653-660. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i2.5635>
- Martínez, M. C., Arraga-Alvarado, C. M., Triana-Alonso, F. J., Ruiz, J. A., & Gutiérrez, C. N. (2015). Estudio serológico y molecular de *Ehrlichia canis* en perros de una comunidad del estado Aragua, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(4), 648-656. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11220>

- McCabe, E. R. B. (1991). Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters. *PCR Methods and Applications*, 1(2), 99-106. <https://doi.org/10.1101/gr.1.2.99>
- McCabe, L. L., & McCabe, E. R. B. (2002). Newborn screening as a model for population screening. *Molecular Genetics and Metabolism*, 75(4), 299–307. [https://doi.org/10.1016/S1096-7192\(02\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1096-7192(02)00005-7)
- Núñez, L., Rodríguez, M. I., Giménez, G., & Martínez, R. (2018). Evaluación y comparación de dos protocolos de extracción de ADN a partir de tres tipos de muestras de ovinos. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 11(2), 18-23. <https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2021.11.02.18>
- Núñez Yegros, O. L., Narváez Quiñónez, M. L., Araujo Oviedo, A. M., Giménez Bareiro, G., Florentín Ibarra, I. P., & Ramírez Ayala, L. C. (2025). Detección y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* ADN de muestras de sangre de bovinos provenientes de Paraguay. *Revista Investigaciones y Estudios – UNA*, 16(2), 6-17. <https://doi.org/10.18004/rdgic.Investig.estud.UNA.2025.diciembre.3016025171>
- Páez-Triana, L., Muñoz, M., Herrera, G., Moreno-Pérez, D. A., Tafur-Gómez, G. A., Montenegro, D., Patarroyo, M. A., Paniz-Mondolfi, A., & Ramírez, J. D. (2021). Genetic diversity and population structure of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato across different regions of Colombia. *Parasites & Vectors*, 14(1), 424. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04898-w>
- Pérez-Macchi, S., Pedrozo, R., Bittencourt, P., & Müller, A. (2019). Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 62, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.015>
- Silaghi, C., Santos, A. S., Gomes, J., Christova, I., Matei, I. A., Walder, G., Domingos, A., Bell-Sakyi, L., Sprong, H., von Loewenich, F. D., Oteo, J. A., de la Fuente, J., & Dumler, J. S. (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.), 17(1), 12–22. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1960>
- Simon, N., Shallat, J., Wietzikoski, C. W., & Harrington, W. E. (2020). Optimization of Chelex 100 resin-based extraction of genomic DNA from dried blood spots. *Biology Methods and Protocols*, 5(1), bpaa009. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa009>
- Singh, U. A., Kumari, M., & Iyengar, S. (2018). Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online* 20, 12. <http://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>
- Smit, P. W., Elliott, I., Peeling, R. W., Mabey, D., & Newton, P. N. (2014). An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 195-210. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0463>