



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
FACULTAD DE CIENCIAS DE AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CLÍNICA Y CIRUGÍA DE PEQUEÑAS ESPECIES

Tema de tesis:

Detección molecular y análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros atendidos en el centro médico veterinario “*Biospet*” en el Cantón Santa Rosa (Ecuador)

Autora

MVZ. Karen Guerrero Ochoa.

Modalidad de titulación:

Proyecto de desarrollo.

TUTOR:

Mvz. Fernando Lenin Aguilar Gálvez. PhD (c)

Machala, 2024

DEDICATORIA

Con profundo agradecimiento a Dios, quien ha sido mi guía constante en este camino de aprendizaje y crecimiento. A mis queridos padres, por su inquebrantable apoyo y amor incondicional que han sido mi mayor motivación. A mi esposo, mi compañero de vida y fuente de inspiración, por su comprensión, paciencia y aliento en cada paso de este viaje académico. A mis adorables hijos, Eduardo y Eduarda quienes han sido mi razón más grande para esforzarme y alcanzar mis metas. A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento por ser mi sostén y mi mayor fuente de fortaleza. Esta tesis está dedicada a cada uno de ustedes, por ser mi motor y mi mayor inspiración. ¡Gracias por estar siempre a mi lado!

Karen Paola Guerrero Ochoa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de corazón a la Universidad Técnica de Machala por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y avanzar un escalón más en mi vida profesional. Mi más sincero agradecimiento a los distinguidos docentes que compartieron su conocimiento y experiencia conmigo, en especial a mi tutor, el Dr. Fernando Lenin Aguilar, cuya orientación fue fundamental en mi formación.

Quiero expresar mi profunda gratitud a la Dra. Lorena Zapata, coordinadora de este programa, por su constante apoyo y orientación a lo largo de este camino. También agradezco a mis compañeros, cuya colaboración y compañerismo hicieron de esta travesía una experiencia enriquecedora.

En este momento de logro, mi reconocimiento más especial se dirige a Dios, fuente de sabiduría y fortaleza, por guiarme en este camino y permitirme alcanzar esta meta. A mi amada familia, en particular a mis hijos, les agradezco por su inquebrantable apoyo, comprensión y amor durante este capítulo de mi vida. Su aliento fue mi mayor impulso en los momentos difíciles y su alegría, mi mayor motivación.

Esta tesis es el resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas, y a todas ellas les estoy profundamente agradecido. Que este logro sea un testimonio de nuestro trabajo en equipo y un homenaje a la dedicación y pasión por la medicina veterinaria. ¡Gracias a todos por formar parte de este importante capítulo de mi vida!

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, Karen Paola Guerrero Ochoa con C.I. 0706118742, declaro que el trabajo de “Detección molecular y análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros atendidos en el centro médico veterinario “*Biospet*” en el Cantón Santa Rosa (Ecuador)”. en opción al título de Magister en Clínica y Cirugía en Pequeñas Especies Cohorte II, es original y auténtico; cuyo contenido: conceptos, definiciones, datos empíricos, criterios, comentarios y resultados son de mi exclusiva responsabilidad.

Karen Paola Guerrero Ochoa.

C.I.: 0707118742

Machala, 2025/01/12

REPORTE DE SIMILITUD URKUND/TURNITIN

Detección molecular y análisis filogenético de ehrlichia canis en perros atendidos en el centro médico veterinario "Biospet" en el cantón Santa Rosa, Ecuador

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

2%

★ es.khanacademy.org

Fuente de Internet

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, Fernando Lenin Aguilar Gálvez con C.I. 0704217348, tutor del trabajo de titulación “Detección molecular y análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros atendidos en el centro médico veterinario “Biospet” en el Cantón Santa Rosa (Ecuador)”, modalidad Tesis de grado, en opción al título de Magister en Clínica y Cirugía en Pequeñas Especies Cohorte II, declaro que el trabajo ha sido revisado, y está enmarcado en los procedimientos científicos, técnicos, metodológicos y administrativos establecidos por la Dirección de Posgrado de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH), razón por la cual doy fe de los méritos suficientes para que sea presentado a evaluación.

Fernando Lenin Aguilar Gálvez
0704217348

Machala, 2025/01/12

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Karen Paola Guerrero Ochoa con C.I. 0706118742, autor del trabajo de titulación “Detección molecular y análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros atendidos en el centro médico veterinario “*Biospet*” en el Cantón Santa Rosa (Ecuador)”, en opción al título de Magister en Clínica y Cirugía en Pequeñas Especies Cohorte II, declaro bajo juramento que:

- El trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido presentado previamente para ningún grado o calificación profesional. En consecuencia, asumo la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.
- Cede a la Universidad Técnica de Machala de forma exclusiva con referencia a la obra en formato digital los derechos de:
 - a. Incorporar la mencionada obra en el repositorio institucional para su demostración a nivel mundial, respetando lo establecido por la Licencia *Creative Commons Attribution-NoCommercial* – Compartir Igual 4.0 Internacional (CC BY NCSA 4.0); la Ley de Propiedad Intelectual del Estado Ecuatoriano y el Reglamento Institucional.
 - b. Adecuarla a cualquier formato o tecnología de uso en INTERNET, así como correspondiéndome como Autor/Autora la responsabilidad de velar por dichas adaptaciones con la finalidad de que no se desnaturalice el contenido o sentido de la misma.

Karen Paola Guerrero Ochoa
0706118742

Machala, 2025/01/12

RESUMEN

La ehrlichiosis es una enfermedad bacteriana prevalente en áreas tropicales y subtropicales, transmitidas por garrapatas infectadas con hemoparásitos. El agente causal, *Ehrlichia canis*, es una bacteria intracelular gramnegativa de la familia *Anaplasmataceae*, orden *Rickettsiales*, que afecta principalmente a monocitos y macrófagos. Esta bacteria, de tamaño pequeño y morfológico variable, puede causar una amplia gama de síntomas clínicos, desde agudos hasta crónicos severos, incluyendo uveítis ocular. Diversas herramientas diagnósticas se utilizan para detectar la ehrlichiosis, como análisis de frotis sanguíneo, métodos serológicos y pruebas de Elisa; sin embargo, estos métodos tienen limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad.

La técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la secuenciación de ADN son más precisas y sensibles, permitiendo una identificación exacta de la patógena cuantificación de la carga bacteriana. Este estudio se centra en la identificación molecular de *Ehrlichia canis* mediante secuenciación de ARNr 16s en perros atendidos en el centro médico veterinario “Biospet”, en el Cantón Santa Rosa, Ecuador. La elección de métodos moleculares, como el PCR, se deben a su alta precisión en la detección de *Ehrlichia spp.*, evitando confusiones con otras especies y mejorando significativamente el diagnóstico. Dada la escasez de reportes de secuenciación de *E. canis* en Ecuador, esta investigación pretende proporcionar un diagnóstico más confiable y preciso de la bacteria.

Palabras clave: Filogenia, Amplificación de ADN, ARNR s16, Sanger.

ABSTRACT

Ehrlichiosis is a bacterial disease prevalent in tropical and subtropical areas, transmitted by ticks infected with hemoparasites. The causative agent, *Ehrlichia canis*, is a gram-negative intracellular bacterium of the family *Anaplasmataceae*, order *Rickettsiales*, which mainly affects monocytes and macrophages. This bacterium, of small size and variable morphology, can cause a wide range of clinical symptoms, from acute to severe chronic, including ocular uveitis. Several diagnostic tools are used to detect ehrlichiosis, such as blood smear analysis, serological methods and Elisa tests. However, these methods have limitations in terms of sensitivity and specificity.

The polymerase chain reaction (PCR) technique and DNA sequencing are more accurate and sensitive, allowing accurate identification of the pathogen and quantification of the bacterial load. This study focuses on the molecular identification of *Ehrlichia canis* by 16s rRNA sequencing in dogs treated at the “*Biospet*” veterinary medical center in Santa Rosa, Ecuador. The choice of molecular methods, such as PCR, is due to its high accuracy in the detection of *Ehrlichia spp.* avoiding confusion with other species and significantly improving the diagnosis. Given the scarcity of reports of sequencing of *E. canis* in Ecuador, this research aims to provide a more reliable and accurate diagnosis of the bacterium.

Keywords: Phylogeny, DNA amplification, s16 RNAR, Sanger.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	4
REPORTE DE SIMILITUD URKUND/TURNITIN	5
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	6
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
ÍNDICE GENERAL.....	10
LISTA DE ILUSTRACIONES Y TABLAS	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Objetivo general:	14
Objetivos específicos	14
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.....	15
1.1 GENERALIDADES DE LA EHRLICHIOSIS CANINA.	15
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	15
1.3 HISTORIA.	15
1.4 TAXONOMÍA.....	16
1.5 MORFOLOGÍA.....	17
1.6 CICLO DE VIDA.....	18
1.7 EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.2.1 A nivel nacional.....	21
1.2.2 A nivel regional.	21
1.8 TRANSMISIÓN.....	21
1.9 MANIFESTACIONES DE LA ENFERMEDAD.	21
1.9.1 Fase agua.	22
1.9.2 Fase Subclínica.....	22
1.9.3 Fase Crónica.....	23
1.10 Diagnostico.	23
1.10.1 Diagnostico mediante frotis sanguíneo.....	23
1.10.2 Diagnóstico serológico.	23
1.10.3 Diagnostico inmunocromatografía (IC)	24
1.10.4 Diagnóstico molecular.....	24
1.11 PCR en <i>Ehrlichia</i>	29

1.12	SECUENCIACIÓN.....	31
1.12.1	Secuenciación SANGER.....	31
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....		34
2.1	TIPO DE ESTUDIO.	34
2.2	PARADIGMA.	34
2.3	UBICACIÓN.....	34
2.4	POBLACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	35
2.4.1	Criterios de exclusión.	35
2.4.2	Criterios de inclusión.	35
2.5	MATERIALES.....	35
2.6	INMUNOCROMATOGRAFÍA.....	36
2.7	EXTRACCIÓN DE ADN.	37
2.8	LA DETECCIÓN MOLECULAR DEL ADN DE <i>E. canis</i>	38
2.9	SECUENCIACIÓN Y ÁRBOL FILOGENÉTICO.	38
CAPITULO 3: RESULTADOS.....		40
3.1	DETERMINACIÓN DE <i>E. canis</i> POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE INMUNOCROMATOGRÁFICA (IC).	40
3.2	DETERMINACIÓN DE <i>E. canis</i> POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PCR	41
3.3	SECUENCIAS EN NCBI DE <i>Ehrlichia canis</i> OBTENIDAS	41
3.3.1	Secuencia 1: <i>Ehrlichia canis</i> isolate 1a UTMACH.....	42
3.3.2	Secuencia 2: <i>Ehrlichia canis</i> isolate 1b UTMACH.....	42
3.4	ÁRBOL FILOGENÉTICO DE <i>Ehrlichia canis</i> UTMACH – ECUADOR.	43
3.4.1	Árbol Filogenético de <i>Ehrlichia canis</i> ECUADOR y su relación con países Latinoamericanos y europeos.....	44
3.4.2	Árbol Filogenético de <i>Ehrlichia canis</i> ECUADOR y su relación con países latinoamericanos.....	46
CAPITULO 4: DISCUSIÓN.		48
CONCLUSIONES.....		54
RECOMENDACIONES.....		58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		60
ANEXOS.....		67

LISTA DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de Ehrlichia spp. hasta el nivel de especie.....	17
Tabla 2 Ventajas y desventajas entre las técnicas moleculares.	29
Table 3 Identificación de E. canis mediante Test de Inmunocromatografía (IC) en el centro médico veterinario “Biospet” – Santa Rosa.	40
Tabla 4 Identificación de E. canis mediante PCR en el centro medico veterinario “Biospet” – Santa Rosa.	41
Table 5 Porcentajes de identidad entre la secuencia 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence y secuencia 1b UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	42
Tabla 6 Secuencias comparativas de Ehrlichia canis a nivel global.....	44
Table 8 Secuenciación comparativa de Ehrlichia canis, en relación con países latinoamericanos.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Test de inmunocromatografía positivo a E. canis.	36
Figure 2 Alineamiento entre las secuencias ecuatorianas Ehrlichia canis isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [PP587406] y Ehrlichia canis isolate 1b UTMACH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [PP587407].....	43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Identificación de E. canis, mediante Test de IC.	40
Gráfico 2 Identificación de E. canis, mediante PCR.	41
Gráfico 3. Árbol Filogenetico de Ehrlichia canis, en relación con países Latinoamericanos y europeos.	45
Gráfico 4 Filogenia de Ehrlichia canis, en relación con países latinoamericanos.....	46

INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis es una enfermedad bacteriana se encuentra de forma prevalente en áreas tanto tropicales como subtropicales a nivel mundial, siendo transmitida por las garrapatas infectadas que portan hemoparásitos (45). El agente causal, *Ehrlichia*, es una bacteria intracelular obligada de naturaleza gram negativa, con relevancia zoonótica significativa en la medicina veterinaria. Esta bacteria pertenece a la familia *Anaplasmataceae* (9,45) dentro del orden *Rickettsiales* y afecta principalmente a monocitos y macrófagos (9). Esta bacteria, de tamaño relativamente pequeño (0.4 - 1.5 μm), presenta una morfología variable, pudiendo adoptar formas pleomórficas o redondas (45).

Esta variabilidad morfológica está asociada con la capacidad de generar una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde síntomas agudos hasta cuadros crónicos severos (46). Entre estos síntomas, se pueden observar afectaciones oculares como la uveítis, que, mediada por células inflamatorias, puede ocasionar una infiltración inflamatoria y la formación de complejos inmunitarios. Estos complejos pueden alojarse en el sistema de irrigación ocular, provocando un desequilibrio en las barreras oculares, lo que facilita el paso de monocitos y linfocitos hacia la úvea, generando una serie de signos clínicos diversos (9,46).

Hay diversas herramientas diagnósticas para detectar la Ehrlichiosis; una de las más comunes es el análisis de un frotis sanguíneo de la capa blanca. Además, se emplean métodos serológicos, como la inmunofluorescencia, aunque esta técnica tiene limitaciones al no distinguir entre infecciones latentes o pasadas. En la actualidad, hay kits comerciales disponibles que utilizan el microorganismo completo como fuente de antígenos en pruebas ELISA. También se recurre a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a la secuenciación, las cuales son herramientas más sensibles que proporcionan tanto un diagnóstico como una evaluación cuantitativa de la carga bacteriana (46).

Por tanto, el análisis molecular del microorganismo se presenta como la opción más precisa para la identificación de los agentes causales de enfermedades, evitando posibles confusiones entre diferentes especies o tipos de microorganismos que podrían generar resultados conflictivos en pruebas serológicas poco sensibles y específicas. En contraste, las técnicas de PCR ofrecen una mayor precisión en la detección de organismos pertenecientes al género *Ehrlichia* (49). Estas metodologías moleculares posibilitan la identificación del ADN a través de la PCR (46,49). La calidad de las secuencias depende del diseño de los cebadores, que son

secuencias de nucleótidos diseñadas para unirse al ADN/ARN del agente infeccioso y permitir su amplificación posterior (10).

Estos cebadores pueden ser específicos para reconocer un género como, por ejemplo, *Ehrlichia* spp. O una especie particular, por ejemplo, *Ehrlichia canis* (10). Actualmente, se emplean pruebas serológicas altamente sensibles y fiables (46,49). No obstante, la elevada necesidad de atender a pacientes con síntomas de Ehrlichiosis y el uso simultáneo de varios métodos diagnósticos, pueden generar ambigüedades en el diagnóstico. En la actualidad, existen pocos reportes en secuenciación sobre *E. canis* en el Ecuador y por esta razón el objetivo de esta investigación se centra en la técnica molecular dado que nos permite diagnosticar de forma más confiable y precisa la bacteria.

Objetivo general:

Analizar la secuencia del gen ARN16S mediante el método de secuenciación de SANGER para determinar caracterización genética de muestras positivas a *Ehrlichia canis* positivos a PCR

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Ehrlichia canis* por medio de Inmunocromatografía (IC).
- Identificar mediante la prueba de Reacción de la cadena de polimerasa (PCR) la presencia de *Ehrlichia canis* en perros atendidos en el centro médico veterinario Biospet en el Cantón Santa Rosa.
- Secuenciar el amplicón de *Ehrlichia canis* obtenidos mediante PCR en perros atendidos en el centro médico veterinario Biospet en el Cantón Santa Rosa.

CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.

1.1 GENERALIDADES DE LA EHRLICHIOSIS CANINA.

La Ehrlichiosis Canina Monocítica (ECM) es una enfermedad canina transmitida por garrapatas con una relevancia considerable a nivel global (24). Además de ser conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, tifus, enfermedad del perro rastreador y exposición tropical a las garrapatas caninas (12). Aunque no se ha confirmado que los perros funcionen como un reservorio infeccioso para los humanos, sigue siendo una preocupación importante para muchos dueños de mascotas. Los veterinarios desempeñan un papel crucial en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las infecciones por *Ehrlichia* en los perros.

La principal transmisora de la Ehrlichiosis Canina Monocítica (ECM) es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (6). Se ha confirmado en estudios experimentales que *Dermacentor variabilis* también puede ser un vector de transmisión de *E. canis* (27). Esta enfermedad se manifiesta en formas agudas, subclínicas y crónicas, siendo esta última potencialmente mortal (25). Los síntomas abarcan anorexia, letargo, fiebre, agrandamiento de los ganglios linfáticos y del bazo, junto con episodios hemorrágicos. La presencia de trombocitopenia y pancitopenia son hallazgos habituales en los análisis hematológicos (16).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO.

La garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* es una especie de garrapata ampliamente distribuida en todo el mundo y reconocida como portadora de numerosos patógenos que afectan a los perros, ocasionalmente también a los seres humanos. Esta garrapata se encuentra comúnmente en perros que residen tanto en áreas urbanas como rurales y tiene una notable adaptabilidad para habitar en viviendas humanas, manteniendo su actividad a lo largo de todo el año. Esta adaptabilidad no se limita únicamente a regiones tropicales y subtropicales, sino que también se presenta en zonas de clima templado (18).

1.3 HISTORIA.

Según Ormaza (2021), La identificación inicial de *Ehrlichia canis* se remonta a 1935, en el Instituto Pasteur de Argelia, por Donatien y Lestoquard. Se descubrió esta bacteria al notar síntomas de fiebre aguda y anemia en varios perros residentes en el lugar que estaban infectados por garrapatas. Al examinar las células sanguíneas de estos perros enfermos, se observaron microorganismos dentro de los monocitos, inicialmente asociados erróneamente con alguna especie de *Rickettsia*. Posteriormente, en 1945, el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich renombró

este agente como *Ehrlichia canis*. Y Desde entonces, se han documentado casos de Ehrlichiosis en varias naciones de África central y meridional, así como en India y Estados Unidos.

Inicialmente, se consideraba una enfermedad leve, manifestada por fiebre, vómitos y secreción nasal y ocular. A finales de la década de 1960 y principios de la de 1970, estudios adicionales sobre *E. canis* demostraron que este patógeno era el causante del tifus canino, aunque hasta ese momento se asociaba principalmente con casos benignos en otros animales. Por otro lado, en Arica, Chile, se documentó un caso clínico de Ehrlichiosis causada por *E. canis* en un perro, diagnosticado mediante técnicas moleculares. La afectada era una perra mestiza de raza siberiana, de 10 años, que presentaba infección por garrapatas y síntomas como hematomas, sangrado recurrente en la boca y un notable deterioro en su estado de salud general (14).

Los exámenes revelaron una disminución en el recuento de plaquetas, con un total de 30,000 plaquetas/mm³, y un resultado positivo para *E. canis* en una prueba inmunocromatográfica rápida. La secuenciación y amplificación de un fragmento específico del gen 16S ARNr a partir de una muestra de sangre confirmaron una coincidencia total con una cepa de *E. canis*, esta proveniente de Perú. La presencia de *E. canis* en Chile fue reportada por primera vez en 2012 (14). Existen diversas variantes de *Ehrlichia* que afectan a los perros, como *E. platys*, que causa la trombocitopenia cíclica infecciosa; *E. equi*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*, las cuales también pueden infectar a los perros, generando síntomas subclínicos o manifestaciones clínicas menos graves (45,46).

La *E. canis* es un microorganismo que se encuentra en el citoplasma de los leucocitos (9,46), principalmente en monocitos y linfocitos (45,46), ya sea como cuerpos individuales, conocidos como cuerpos elementales, o en agrupaciones llamadas mórulas. Las otras variantes de *E. canis* presentan morfologías similares; sin embargo, *E. platys* infecta exclusivamente a las plaquetas, mientras que *E. equi* afecta a los neutrófilos o eosinófilos. Se sospecha que *E. canis* es el agente responsable de la Ehrlichiosis en seres humanos (4).

1.4 TAXONOMÍA.

El género *Ehrlichia* spp. como *Anaplasma* spp. pertenecen a la familia *Anaplasmataceae*, previamente a la bacteria *Ehrlichia* spp. se la clasificaba en la familia *Rickettsiaceae* y *Anaplasma* spp. en la familia *Anaplasmataceae*, dentro del orden *Rickettsiales*. (52). Las especies de *Ehrlichia* pueden dividirse en tres categorías según las células huésped, incluyendo células monocíticas, granulocíticas y trombocíticas (19). Se delimitaron tres genogrupos de *Ehrlichia* basados en la homología de la secuencia del ARNr 16S y la relación antigénica: (i)

genogrupo *E. canis* (*E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*); (ii) genogrupo *E. phagocytophila* (*E. phagocytophila*, *E. equi*, el agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana (HGE) y *A. platys*); y (iii) genogrupo *E. senetsu* (*E. sennetsu*, *E. resticii* y *E. bovis*) (43).

Recientemente, se ha reorganizado la clasificación de los géneros de las familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae* tras el análisis de las secuencias del ARNr 16S. La familia *Anaplasmataceae* ahora comprende los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, como se observa en la Tabla 1. Dentro del género *Anaplasma* se propuso incluir algunas especies de *Ehrlichia*, como *E. (Anaplasma) phagocytophila* (que incluye *E. equi* y el agente HGE), *E. (Anaplasma) bovis* y *E. (Anaplasma) platys*. Una de estas especies fue trasladada al género *Neorickettsia*, siendo *E. (Neorickettsia) sennetsu*, y una especie del género *Cowdria* fue reclasificada como *Cowdria (Ehrlichia) ruminantium* (7).

Categoría Taxonómica	Clasificación
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Género	<i>Ehrlichia</i>
Especies Principales	<i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>E. ewingii</i> , <i>E. muris</i> .

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Ehrlichia* spp. hasta el nivel de especie.

1.5 MORFOLOGÍA.

Ristik (1992), indica que la bacteria es reconocida por ser un microorganismo pleomórfico, con forma de coco y estructura Gram negativa. Se puede observar como un cuerpo elemental o en agrupaciones llamadas mórulas dentro del citoplasma de los leucocitos infectados, principalmente en linfocitos y monocitos cuando se utilizan colorantes de tipo *Romanowsky*; estas células aisladas se identifican como cuerpos elementales con un diámetro de 0.4 micras, a partir de los cuales se desarrollan otras estructuras denominadas cuerpos iniciales que varían de 0.4 a 2.5 micras de diámetro, para luego formar mórulas de mayor tamaño, con un diámetro de uno a cuatro micras.

Ehrlichia canis exhibe tropismo por células sanguíneas, como leucocitos y plaquetas, tanto en humanos como en animales. Una vez en el citoplasma, invade vacuolas donde se multiplica por fisión binaria, formando micro colonias denominadas "mórulas" por su aspecto característico.

Este microorganismo utiliza mamíferos como reservorios y artrópodos como vectores esenciales para completar su ciclo de vida y asegurar su transmisión. Su capacidad para replicarse en ambientes intracelulares y su dependencia de hospedadores y vectores resaltan su adaptación evolutiva y patogénesis en diferentes especies (53).

1.6 CICLO DE VIDA.

López (2021), describe en su investigación que el ciclo de vida de *Ehrlichia canis* comprende tres etapas principales; la cual comienza con la penetración de los cuerpos elementales en los monocitos, donde experimentan un desarrollo que se extiende a lo largo de dos días. Luego sigue una fase de multiplicación de *E. canis*, que se extiende por un lapso de tres a cinco días, durante la cual se desarrollan cuerpos iniciales. Finalmente, se observa la formación de mórulas, resultado de la agrupación de los cuerpos básicos envueltos por una membrana. A lo que Pinedo (2018), agrega que el período de incubación de la bacteria *Ehrlichia canis* abarca de ocho a 20 días.

Posteriormente, emerge la fase aguda caracterizada por fiebres intermitentes y pérdida de apetito. Esta etapa es seguida por una fase subclínica, que puede prolongarse durante meses o años, y finalmente se desarrolla la fase crónica. Además, indica que la infección en las garrapatas ocurre durante su etapa de desarrollo y no a través de la transmisión vertical, es decir, las ninfas se infectan al alimentarse de la sangre de perros enfermos en fase aguda. Sin embargo, también se considera que los perros en fase subclínica actúan como focos de infección.

1.7 EPIDEMIOLOGIA.

Ehrlichiosis canina es una enfermedad endémica y ampliamente distribuida en países tropicales y subtropicales donde el vector está presente. Estudios han revelado seroprevalencias significativas en perros, alcanzando el 33,1% en México, el 30% en Israel, el 16,5% en Perú y el 21,7% en Brasil. Estas cifras la sitúan como una de las enfermedades de mayor relevancia en la práctica veterinaria. (13). En Venezuela, se registra una alta prevalencia de anticuerpos *anti-E. canis* (77.3%) en perros domésticos, mientras que la detección molecular alcanza el 45.2%. Se ha observado que el 69% de los perros evaluados estaban infestados por garrapatas, siendo *Rhipicephalus sanguineus* la especie identificada con mayor frecuencia (33).

Por otra parte, en un estudio realizado en la región de Ageo, en Turquía, se estableció que la prevalencia de *Ehrlichia canis* fue del 24,42% (55). En Lima, se identificó una seropositividad del 23.3% para *E. canis* y del 20% para *E. chaffeensis* (43). En Colombia, se determinó una frecuencia de aparición del 33.3%, lo que confirma la presencia de la bacteria (13). A nivel

nacional en un estudio realizado en la ciudad de Cuenca se determinó la prevalencia de *E. canis* con un 56,25% (35); en Guayaquil se determinó el índice de prevalencia de *E. canis* del 11 % (36) y en Machala, se logró establecer un índice de prevalencia de *Ehrlichia canis* del 4.5% (36).

La Ehrlichiosis Monocítica Canina ha tenido una expansión a nivel global, y en Tailandia se realizó un estudio para explorar la diversidad genética de *E. canis*. Utilizando PCR y análisis filogenéticos de los genes DSB, GP19 y GP36, se investigaron las características moleculares de *E. canis* en 220 muestras de sangre completa de perros naturalmente infectados, todos con manifestaciones clínicas asociadas a enfermedades transmitidas por garrapatas. De todos los animales analizados, un 16,4% (36/220) mostró ADN positivo para genes de *E. canis* a través de DSB y GP19, mientras que solo 13 de esas 36 muestras 36,1% dieron positivo para el gen GP36 (17).

Las secuencias del gen DSB mostraron una similitud muy alta 99 al 100% con secuencias previamente documentadas de *E. canis*. Por otro lado, las secuencias del gen GP19 revelaron semejanzas con genogrupos de Estados Unidos y Taiwán, con rango de identidad del 98,8% al 99,5%. La caracterización genética basada en el gen GP36 exhibió una similitud compartida del 91,4% al 99,1%, con la identificación de 426-429 pares de bases en una región en tándem en el extremo 5', una repetición de 27 pares de bases con variabilidad en el número de repeticiones en tándem (TR) de nueve secuencias de aminoácidos (TEDSVSAPA), y una región terminal 3' variable con longitud dependiente del aislado de 72 a 93 pares de bases (17).

Los árboles filogenéticos, especialmente los contruidos a partir de secuencias de aminoácidos de GP36, mostraron que las cepas tailandesas se dividían en dos clases filogenéticas, integradas dentro de otras cepas de *E. canis* a nivel global. El análisis filogenético sugiere que las cepas de *E. canis* en Tailandia podrían agruparse en dos genogrupos distintos, alineados con las cepas de Estados Unidos y Taiwán (17). En México se llevó a cabo un estudio para identificar infecciones por rickettsiosis en perros. Se recolectaron muestras sanguíneas de 246 perros, las cuales se analizaron inicialmente para detectar la presencia de *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Rickettsia rickettsii* mediante una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (37).

De estos, 65 fueron evaluados y muestreados dos veces con intervalo de siete u ocho meses entre cada toma. El análisis a través de qPCR identificó a 72 perros como portadores de *E. canis* con una prevalencia del 29,26%. Estos mismos fueron sometidos a pruebas de PCR anidada

para la detección de estos patógenos. Ninguno arrojó resultados positivos para *E. chaffeensis*, *E. ewingii* o *R. rickettsii* en ambas pruebas de PCR. La incidencia acumulada de la infección por *E. canis* fue del 38,46%. El análisis de secuenciación de los productos obtenidos mediante PCR anidada mostró una coincidencia del 100% con *E. canis* y del 98,1% con *R. parkeri*. Se identificó un perro coinfectado con *E. canis* y *R. parkeri* (37).

En una comunidad rural del estado de Aragua, Venezuela, se identificaron anticuerpos *anti-E. canis* tanto a nivel molecular como mediante pruebas de laboratorio. De un total de 110 muestras sanguíneas de perros domésticos analizadas utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y PCR, se evidenció una seroprevalencia del 77,3% y una detección molecular del 45,2%. Además, se constató la presencia de *Rhipicephalus sanguineus* en el 69% de los perros evaluados, y se observó que el 80% (68 de 85) de los perros infestados con garrapatas dieron positivo en las pruebas serológicas (41).

En Cauca, Colombia, se realizó un estudio que involucró a 506 residentes sanos y 114 perros de cuatro municipios. Se recopilaron muestras sanguíneas para evaluar la presencia de anticuerpos contra *E. canis* tanto en suero humano como en perros. Se emplearon el ELISA del péptido de repetición en tándem 19 (TRP19) y la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA). De estos resultados, se detectó que únicamente 1 de los 506 sueros humanos presentaba anticuerpos contra el péptido TRP19 de *Ehrlichia canis*, aunque esta muestra positiva no fue confirmada por la prueba de IFA.

Por otro lado, se observó que la mayoría de los perros estudiados de los cuales 75 de 114; es decir, el 66% tenían anticuerpos detectados contra el péptido TRP19 de *E. canis* mediante ELISA, y ocho muestras seleccionadas aleatoriamente fueron confirmadas adicionalmente por IFA de *E. canis*. Se procedió a analizar el ADN genómico de 73 muestras de sangre de perros que resultaron positivas para *E. canis* TRP19 mediante PCR dirigida al gen del ácido ribonucleico 16S (ARNr). Se logró amplificar el ARNr 16S de *Ehrlichia canis* en 30 de los perros, es decir el 41%. De estas muestras, se seleccionaron 16 para secuenciar su ADN, confirmando la presencia de *E. canis* en todos los casos.

Posteriormente, se realizó una segunda PCR en las 16 muestras positivas para el ARNr 16S de *E. canis* para determinar el genotipo TRP36 mediante la amplificación del gen *trp36*. La secuenciación del amplicón de la PCR TRP36 reveló que nueve perros estaban infectados con el genotipo TRP36 de *E. canis* de Estados Unidos con resultados del 56%; un perro con el genotipo brasileño un 6% y seis perros con el genotipo costarricense representando el 38%.

Estos hallazgos moleculares del genotipo coincidieron con el análisis serológico utilizando péptidos específicos del genotipo TRP36 (35).

1.2.1 A nivel nacional.

En el trabajo realizado por Ormaza (2021), se recolectaron 203 muestras sanguíneas de perros para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* utilizando análisis de frotis; de los datos obtenidos del total de perros analizados, el 73,89% mostró resultados positivos de 150 casos, siendo el 41,87% machos y el 32,02% hembras. Los factores principales asociados a la prevalencia de *Ehrlichia canis* fueron la edad representando un 53,85% en perros de tres a seis años; además de, el tipo de alimentación y hábitat con resultados del 56,67% en perros que consumían comida casera y vivían dentro o fuera de la casa, y el cuidado veterinario inadecuado que representa el 36,67% sin control de ectoparásitos, baños, garrapaticidas o desparasitaciones.

1.2.2 A nivel regional.

Según lo reportado por Pauta (2016), en un estudio realizado con 80 animales, se detectó la presencia de *Ehrlichia canis* en 17 individuos, lo que equivale al 21,25% del total de la muestra. Los restantes 63 animales, correspondientes al 78,75%, presentaron resultados negativos. La investigación consideró diversas variables como la edad, el sexo y la raza de los animales, permitiendo un análisis integral de los factores asociados a la presencia de la infección. Estos hallazgos subrayan la importancia de evaluar características individuales y demográficas en el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad en poblaciones caninas.

1.8 TRANSMISIÓN.

La transmisión de la *Ehrlichia canis* se realiza a través de la picadura de la garrapata llamada *Rhipicephalus sanguineus* y posiblemente por otras especies como la *Ehrlichia chaffensis* (36). La infección se produce cuando una garrapata ha tomado sangre de un animal infectado y luego, al atacar a otro animal, transfiere el microorganismo de manera mecánica. (15). Las secreciones de las glándulas salivares de la garrapata representan el factor de transmisión hacia el perro. Estas secreciones, junto con la inflamación ocasionada por la picadura, promueven la migración de leucocitos a esa zona, lo que facilita la entrada de la *Ehrlichia* en dichas células. (38).

1.9 MANIFESTACIONES DE LA ENFERMEDAD.

Este microorganismo invade los monocitos y macrófagos del huésped al que infecta, esto desencadena una intensa activación del sistema inmunológico y diversas manifestaciones

clínicas en el huésped. La enfermedad progresa en tres etapas: aguda, subclínica y crónica. En la fase aguda, los signos clínicos incluyen fiebre, letargia, linfadenopatía y trombocitopenia (5). En la fase crónica, los caninos afectados pueden desarrollar anemia, trastornos hemorrágicos, inmunosupresión y, en casos graves, insuficiencia orgánica múltiple, lo que compromete significativamente la supervivencia del animal (15).

1.9.1 Fase aguda.

En la etapa inicial, los signos tienden a ser sutiles e involucran fiebre no específica, falta de apetito, agrandamiento de los ganglios linfáticos, sequedad en los ojos y dificultad para respirar. Además, es posible observar agrandamiento del bazo y el hígado, problemas respiratorios o dificultad para ejercitarse debido a inflamación pulmonar, manifestaciones neurológicas como inflamación del cerebro y las membranas que lo rodean, así como pequeñas manchas rojas y moretones debido a la disminución de plaquetas. En esta etapa, los exámenes para detectar anticuerpos pueden resultar negativos (5).

Ormaza (2021), en su investigación señala que el periodo de incubación en esta etapa oscila entre ocho y 20 días después de que la garrapata ha mordido al hospedero. Durante este tiempo, la *Rickettsia* se replica en los monocitos y migra hacia el fagocito mononuclear, donde establece la célula objetivo. Pinedo (2018), agrega que las bacterias que han proliferado en las células monocíticas se dispersan por la corriente sanguínea o el sistema linfático hacia órganos que contienen un mayor número de fagocitos mononucleares, como el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos. Esta diseminación conduce a la manifestación inmediata de síntomas clínicos en el animal infectado.

1.9.2 Fase Subclínica.

López (2021), en su trabajo de investigación interpreta la fase subclínica como una etapa en la que los perros no han recibido tratamiento oportuno. Durante este período, no se presentan signos externos de la enfermedad y el microorganismo puede permanecer en el cuerpo del animal durante hasta cinco años si el sistema inmunológico no puede eliminarlo por completo. De acuerdo con Cairó y colaboradores (1988), durante esta fase, los perros pueden recuperar el peso perdido y normalizar su temperatura corporal. Se ha observado que, en algunos animales con un sistema inmunológico competente, el parásito puede ser eliminado.

1.9.3 Fase Crónica.

Las causas que determinan la progresión de la infección a la fase crónica no se ha establecido de forma concreta, debido a que hay casos en los que los animales pueden eliminar el agente infeccioso por sí mismos, gracias al desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva (15). Según Torres (2018), durante este periodo, los individuos pueden experimentar una alta tasa de mortalidad, manifestándose a través de signos y síntomas como supresión de la médula ósea, problemas oculares y hemorragias severas.

1.10 Diagnóstico.

El diagnóstico definitivo de la ehrlichiosis canina se basa en la observación de mórulas intracitoplasmáticas en monocitos a través de citología, la detección serológica de anticuerpos específicos empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y la identificación molecular del ADN del patógeno mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos complementarios permiten una mayor precisión diagnóstica, ya que integran evidencias morfológicas, serológicas y genéticas. La citología es útil en estadios agudos de la enfermedad, mientras que la IFA y la PCR son esenciales para confirmar infecciones crónicas o subclínicas, proporcionando un enfoque integral para caracterizar la infección por *Ehrlichia spp.* en diferentes etapas y contextos clínicos (7).

1.10.1 Diagnóstico mediante frotis sanguíneo.

Es un método directo de evaluación que implica la extracción de una pequeña cantidad de sangre sobre un portaobjetos, secándola y luego impregnándola con tinción Giemsa o también con tinción de cielo Romano para su observación al microscopio en busca de la presencia de mórulas que son estructuras definidas, redondas u ovaladas en los monocitos eosinófilos o basófilos. A pesar de ser un método económico, sencillo y rápido, encontrar mórulas en el microscopio puede ser desafiante, especialmente para quienes carecen de experiencia. Se estima que solo el cuatro por ciento de los casos logran identificar con éxito las mórulas, y a veces, las plaquetas u otras células pueden confundirse con los cuerpos de inclusión. (25,19).

1.10.2 Diagnóstico serológico.

Existen diversas técnicas de diagnóstico serológico para la Ehrlichiosis Canina, como la prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFA). Esta prueba identifica la presencia de IgG *anti-E. canis* y se considera la prueba más confiable para el diagnóstico serológico, ya que revela la exposición previa del perro a la bacteria. Los anticuerpos IgM, en cambio, no se

consideran un indicador fiable de infección por *E. canis* debido a su desarrollo irregular durante la enfermedad. Existen varios kits disponibles diseñados para facilitar el diagnóstico clínico, proporcionando pruebas específicas y sensibles, como el kit SNAP 3Dx, que emplea péptidos derivados de las proteínas clave de *E. canis* P30 y P30/31, con una especificidad del 98-100% (32).

1.10.3 Diagnóstico inmunocromatografía (IC)

Es una técnica inmunológica de alta sensibilidad que permite visualizar de la interacción antígeno-anticuerpo mediante la acumulación de oro coloidal conjugado en áreas específicas de membranas de nitrocelulosa, donde previamente se han inmovilizado anticuerpos de captura. Actualmente, este método se ha consolidado como una herramienta esencial para el diagnóstico rápido de múltiples enfermedades, facilitando la detección de antígenos en diversos fluidos biológicos. Su aplicación abarca un amplio espectro de patologías, incluyendo infecciones por *Streptococcus β-hemolítico*, *Chlamydia*, virus de la hepatitis, malaria y *Ehrlichia*, entre otras (21).

1.10.4 Diagnóstico molecular.

La metodología del diagnóstico molecular representa un enfoque sofisticado para la identificación precisa de patógenos y el análisis de sus características genéticas. Este método se basa en la detección y amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, de los microorganismos involucrados. En este contexto, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se destaca como una de las herramientas más utilizadas. Esta técnica permite la amplificación específica de fragmentos de ADN con altos niveles de precisión y sensibilidad, lo que la convierte en un recurso fundamental en estudios de diagnóstico, investigación biomédica y aplicaciones clínicas, proporcionando resultados confiables y rápidos que facilitan la comprensión de procesos infecciosos y el desarrollo de estrategias terapéuticas avanzadas (45,10,22).

La PCR, desarrollada por Kary Mullis en 1983, se basa en un ciclo repetido de desnaturalización, hibridación y elongación, donde se utilizan oligonucleótidos (corto segmentos de ADN) como cebadores, y una enzima clave, la ADN polimerasa, para sintetizar nuevas cadenas de ADN; el principio fundamental de la PCR es la polimerización del ADN, un proceso en el que la ADN polimerasa cataliza la adición secuencial de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) a una cadena de ADN en crecimiento, utilizando una cadena de

ADN plantilla como guía (10,32,49). Durante la PCR, esta enzima es responsable de la replicación in vitro de la secuencia de interés, amplificándola de manera exponencial (17,32).

El proceso comienza con una desnaturalización del ADN, donde las dos cadenas de la doble hélice se separan, luego los cebadores se hibridan a las secuencias específicas de interés, y la ADN polimerasa extiende las cadenas de ADN desde los cebadores, replicando la secuencia objetivo (32,49). La enzima ADN polimerasa, especialmente la Taq polimerasa, derivada de la bacteria *Thermus aquaticus*, es fundamental en este proceso debido a su capacidad para operar a temperaturas elevadas; crucial dado que la PCR implica ciclos de calentamiento a temperaturas que oscilan entre 94°C y 60°C. Esta enzima, por tanto, facilita la polimerización del ADN al añadir nucleótidos complementarios a la cadena de ADN en crecimiento, siguiendo la secuencia dictada por la plantilla original (44).

Cada ciclo de PCR duplica la cantidad de ADN de interés, lo que permite obtener millones de copias de una secuencia específica en pocas horas (44). La técnica molecular se fundamenta en el aislamiento y purificación del ADN bacteriano, optimizando su integridad para su posterior análisis. Este proceso involucra la fragmentación, amplificación y evaluación de la variabilidad ya sea ganancia o pérdida en los sitios de restricción, lo cual facilita la identificación de genes relacionados con la etiología, patogenia y posibles mecanismos de resistencia antimicrobiana (28).

Además, esta metodología permite el estudio de células en diversos estados intermedios, como aquellas viables, pero no cultivables, ampliando el espectro de diagnóstico y comprensión de las infecciones. Las pruebas más comúnmente utilizadas incluyen: PCR (reacción en cadena de la polimerasa), qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), *microarrays*, biosensores, secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento (como la Pirosecuenciación) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). La selección de estas técnicas depende del tipo de muestra que se está analizando, lo que permite una adaptación precisa para la detección y caracterización de organismos patógenos a nivel molecular (28).

1.10.4.1 Tipos de diagnóstico molecular.

1.10.4.1.1 Convencional.

1.10.4.1.1.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), posee una alta sensibilidad (96.2%) y especificidad (100%), permite detectar la presencia de *Ehrlichia canis* entre los días cuatro y

10 posteriores a la infección (49). Sin embargo, la posibilidad de contaminación durante el procedimiento podría dar lugar a resultados falsos positivos, subrayando la necesidad de implementar medidas estrictas para minimizar este riesgo. La técnica comúnmente empleada en el diagnóstico molecular de diversos patógenos es la PCR, la cual fue desarrollada hace más de 30 años con el objetivo de amplificar secuencias específicas de ADN cromosomal y plasmídico de cada microorganismo (22,46).

Este proceso permite obtener millones de copias de las secuencias objetivo, facilitando la detección y la identificación precisa de los patógenos presentes en las muestras (22,45,46); La PCR minimiza significativamente el tiempo requerido para la detección e identificación de microorganismos de difícil recuperación, permitiendo el análisis eficiente de diferentes tipos de muestras. Gracias a su alta especificidad y sensibilidad, reduce el tiempo necesario para obtener resultados, acortando el proceso de días a horas en comparación con los métodos convencionales. Por estas ventajas, la PCR se ha consolidado como una herramienta práctica y eficaz para los laboratorios clínicos e industriales, siendo una alternativa fundamental en el diagnóstico de brotes y en el control de calidad de los alimentos (8,20,25,46).

1.10.4.1.1.2 PCR en tiempo real (qPCR).

La PCR en tiempo real (qPCR) es una evolución de la técnica PCR convencional, en la que se elimina el paso de evaluación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. Esta metodología combina la amplificación de secuencias específicas de ADN, proporcionada por la PCR convencional, con la detección de la fluorescencia generada por un fluoróforo que tiene afinidad por el ADN o por sondas marcadas con fluorescencia. Para el marcado de estas sondas, se han desarrollado diversos reactivos químicos, siendo los más relevantes el *SYBR Green* y las sondas de hidrólisis, como las *TaqMan*, que permiten una detección más precisa y cuantitativa de las secuencias diana en tiempo real (20,23,26).

Las principales ventajas de la PCR en tiempo real (qPCR) respecto a la PCR convencional, es la posibilidad de realizar el ensayo en condiciones libres de contaminación con una mínima manipulación por parte del operario, especialmente cuando el proceso es automatizado. En comparación con la PCR convencional, la qPCR proporciona resultados cuantitativos en un menor tiempo con una mayor sensibilidad y seguridad para el operario, al eliminar la necesidad de usar reactivos como el bromuro de etidio. La qPCR está reconocida por la norma ISO 16140 del 2003 y la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) como un método válido para la

detección y cuantificación de patógenos, lo que refuerza su fiabilidad en aplicaciones diagnósticas y de control de calidad (10,22,32,46).

1.10.4.1.1.3 Microarrays (Chip de microarreglos).

Los *microarrays* representan una herramienta de gran valor en el diagnóstico molecular por su capacidad para analizar simultáneamente múltiples secuencias de ácidos nucleicos, lo que permite detectar diversas dianas genéticas o genomas de patógenos en un único ensayo. Esta tecnología es particularmente eficaz para diferenciar microorganismos con alta similitud genética (10,14,32). Un diseño óptimo de *microarrays* puede identificar genes asociados a la virulencia y resistencia a antibióticos, con sondas altamente complementarias que garantizan una unión específica y una detección sensible, incluso en muestras complejas con bajas concentraciones de material genético. Además, su versatilidad permite analizar ADN y ARNm, consolidándose como una herramienta diagnóstica precisa, reproducible y sensible en la investigación molecular (10,32,46).

1.10.4.1.2 Tiempo real.

El diagnóstico molecular en tiempo real se basa en el uso de técnicas avanzadas de análisis molecular que permiten la detección y cuantificación precisa de ácidos nucleicos, secuencias génicas específicas o mutaciones durante la amplificación. Estas metodologías destacan por su elevada sensibilidad, rapidez y capacidad cuantitativa, ofreciendo resultados de alta resolución. Entre las tecnologías más empleadas se encuentra la PCR cuantitativa (qPCR), que se ha consolidado como una herramienta clave debido a su capacidad para proporcionar datos en tiempo real, precisos y reproducibles. Esta técnica es ampliamente utilizada en investigación biomédica, diagnóstico clínico y monitoreo de enfermedades, destacando por su aplicabilidad en estudios genómicos y la detección de agentes infecciosos (10,22).

1.10.4.1.2.1 Transcripción inversa en tiempo real RT-qPCR.

La transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) constituye una metodología molecular sofisticada que integra la transcripción inversa del ARN en ADN complementario (ADNc) y su posterior amplificación cuantitativa mediante PCR en tiempo real (51). Este enfoque se emplea para la detección y cuantificación de ARN específico en muestras biológicas, lo cual resulta fundamental en estudios de expresión génica y en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre otras áreas biomédicas. Durante el proceso, el ARN objetivo se convierte en ADNc mediante la acción de la transcriptasa inversa, y posteriormente, este ADNc es

amplificado y cuantificado mediante PCR en tiempo real, en la que se observa un incremento en la fluorescencia con cada ciclo de amplificación (34,51).

Este fenómeno permite una medición precisa de la cantidad inicial de ARN presente en la muestra. La RT-qPCR se distingue por su alta sensibilidad, capaz de detectar concentraciones extremadamente bajas de ARN, y por su capacidad para generar resultados rápidos, cuantitativos y específicos. Esta técnica se utiliza en el diagnóstico de infecciones virales, estudios de expresión génica, identificación de mutaciones y evaluación de terapias génicas, posicionándola como una herramienta versátil y altamente precisa tanto en la investigación científica como en la medicina clínica (34,51).

1.10.4.1.3 Isotérmica.

El diagnóstico molecular isotérmico es una técnica avanzada, la cual es implementada para amplificar ácidos nucleicos a temperatura constante, eliminando la necesidad de equipos complejos como termocicladores. Métodos como LAMP, RPA y NASBA permiten detectar ADN o ARN rápidamente, con alta sensibilidad y especificidad (54).

1.10.4.1.3.1 Lamp (Loop-mediated Isothermal Amplification):

La amplificación Isotérmica Mediata por Bucle (LAMP), permite la amplificación del ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas. Este método utiliza una ADN polimerasa y un conjunto de cuatro cebadores diseñados para reconocer seis secuencias distintas en el ADN diana. La reacción LAMP se inicia con un cebador interno que contiene secuencias complementarias de las cadenas sentido y anti-sentido del ADN objetivo. Posteriormente, la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, mediada por un cebador externo, libera una cadena de ADN monocatenario, que actúa como plantilla para la amplificación por cebado con los otros cebadores internos y externos (40).

Los cebadores en la técnica LAMP se unen a extremos opuestos del ADN objetivo, formando estructuras de tallo-bucle. Durante los ciclos de amplificación, un cebador interno se hibrida al bucle del producto amplificado, iniciando la síntesis de ADN por desplazamiento. Esto genera productos de tallo-bucle con el doble de longitud que los iniciales. Este proceso cíclico permite la acumulación de hasta 10^9 copias del ADN objetivo en menos de una hora. Los productos finales presentan estructuras tipo coliflor, derivadas de la hibridación entre secuencias invertidas en la misma hebra. La alta especificidad de LAMP radica en su reconocimiento de

seis secuencias iniciales y cuatro adicionales, garantizando la amplificación selectiva del ADN diana (40).

1.10.4.1.3.2 Rpa (Recombinase Polymerase Amplification)

La amplificación por polimerasa recombinasa (RPA) es una técnica molecular de alta sensibilidad y especificidad que funciona eficientemente en un rango térmico de 37 a 42 °C, con requerimientos mínimos de preparación de muestra. Capaz de amplificar entre 1 y 10 copias de ADN diana en menos de 20 minutos, RPA es adecuada para diversos tipos de ácidos nucleicos, incluyendo ARN, miRNA, ssDNA y dsDNA, provenientes de múltiples organismos. Su aplicación se ha extendido a diferentes formatos, como fase líquida, sólida y amplificación puente. Además, RPA se ha integrado exitosamente con métodos de detección variados, desde tiras de flujo lateral hasta sistemas de fluorescencia en tiempo real, consolidándose como una herramienta versátil y eficiente en investigaciones biomoleculares (29).

Técnica Molecular	Ventajas	Desventajas
PCR simple	-Mayor rapidez (4-24 h Vs 5-7 días). -Alta especificidad y sensibilidad. -Automatizado.	-Inhibidores de PCR. -Requiere purificación de ADN. -Alto costo.
PCR Tiempo Real	-Específica y sensible. -Amplificación monitoreada en tiempo real. -Ciclos rápidos. -Reproducibile. -No requiere de post-procesamiento de los productos de amplificación.	-Alto costo. -Inhibidores de la PCR. -Requiere personal capacitado. -La contaminación cruzada.
Microarreglos	-Rapidez. -Análisis múltiple. -Alta sensibilidad y especificidad. -Caracterización de cada cepa.	-Requiere kits o PCR para marcar los genes blancos. -Alto costo. -Pocas plataformas para estudio de patógenos en alimentos.

Tabla 2 Ventajas y desventajas entre las técnicas moleculares.

1.11 PCR en *Ehrlichia*.

En estudios de identificación molecular de *Ehrlichia canis* mediante PCR, los genes diana más utilizados son el 16S rRNA y p30. El gen p30 destaca por la presencia de múltiples copias en el genoma de *E. canis*, lo que incrementa su sensibilidad en las detecciones. Por su parte, el gen 16S rRNA es altamente valorado debido a su capacidad para diferenciar diversas cepas, además

de contener regiones altamente conservadas que comparte con especies del género *Anaplasma*. Estas características hacen que ambos genes sean herramientas clave para la identificación precisa y la caracterización molecular de esta bacteria en estudios clínicos y epidemiológicos. (47,49,56).

La PCR-anidada para la detección de *Ehrlichia canis* es un método altamente específico que emplea dos pares de cebadores para amplificar la región 16S del ARNr, utilizada como objetivo en sangre de animales con síntomas de la enfermedad o antecedentes de contacto con garrapatas. En la primera reacción de PCR, se utilizan los cebadores ECC y ECB, que amplifican no solo *E. canis*, sino también otros procariotas como *Anaplasma* spp. y *E. coli*. El producto amplificado de esta etapa sirve como plantilla para una segunda PCR-anidada, utilizando los cebadores ECAN5 y HE3, que son específicos para *E. canis* (49).

La amplificación se realizó en un volumen total de 20 µL, con un buffer Taq y condiciones estandarizadas de PCR. La amplificación se realizó en dos etapas térmicas, con un perfil de 35 ciclos para la primera PCR, y 37 ciclos para la PCR-anidada, con temperaturas específicas de desnaturalización, hibridación y extensión para cada par de cebadores. Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa con bromuro de etidio y comparados con un marcador de 100 pb para determinar su tamaño. Este enfoque permite una detección altamente específica y sensible de *E. canis* en muestras biológicas, con la capacidad de distinguir entre esta especie y otros patógenos relacionados (49).

La PCR en un solo paso se ha establecido como una herramienta efectiva para la detección molecular de *E. canis*, permitiendo su identificación precisa y sensible en perros infectados. Método utilizado en un estudio diseñado para detectar la presencia de *E. canis* mediante PCR en un solo paso, considerando las posibles variantes moleculares de la bacteria. De un total de 120 perros con síntomas compatibles con *E. canis*, 45 fueron positivos mediante un kit de inmunocromatografía (45/145), lo que refleja una prevalencia del 37.5% de anticuerpos contra *E. canis* (32).

Además, la amplificación por PCR con cebadores específicos para *E. canis* resultó positiva en 14 de los 45 animales inicialmente positivos en la prueba inmunocromatográfica, lo que representa una tasa de infección del 31.11%, con un amplicón final de 409 pb. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de infección en relación con la edad, sexo o raza de los animales ($p > 0.005$), lo que sugiere que estos factores no afectan la incidencia ni la positividad de la enfermedad. Este estudio confirma la presencia de *E. canis* en los animales

mediante PCR en un solo paso, y propone la implementación de esta técnica como herramienta diagnóstica en la ciudad (32).

Se han desarrollado ensayos de PCR en tiempo real basados en *TaqMan* para detectar *Ehrlichia spp.* en perros, y se ha validado un ensayo específico para *E. canis*. Este ensayo mostró una eficiencia del 93%, con un límite de detección del 95% de 33 copias de plásmido de *E. canis* por microlitro de sangre (intervalo de confianza del 95%: 23 - 58). La especificidad del ensayo fue confirmada al ser probado contra otros hemoparásitos. Se observó una alta repetibilidad, con un rango de desviación estándar entre series de 0,33 a 1,29, y un rango de desviación estándar intra-serie de 0,04 a 1,14 (39).

Las muestras de campo fueron analizadas simultáneamente con el ensayo de PCR en tiempo real y un ensayo de hibridación de línea inversa, mostrando una coincidencia en 119 de las 121 muestras analizadas. A través de un análisis de clase latente bayesiano, se determinó una sensibilidad diagnóstica del 90% y una especificidad del 92% para el ensayo de PCR en tiempo real. Este ensayo representa un método de detección molecular sensible y confiable para *E. canis*, constituyendo una herramienta valiosa para el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de esta infección hemoparasitaria (39).

1.12 SECUENCIACIÓN

Es una técnica que nos permite determinar la secuencia de nucleótidos del ADN utilizando didesoxirribonucleótidos (ddNTP) que terminan la cadena de ADN durante la PCR. Los fragmentos resultantes se separan por tamaño mediante electroforesis en gel y se analizan para determinar la secuencia de ADN (50). Los árboles filogenéticos representan las relaciones evolutivas entre organismos, mostrando cómo las especies han evolucionado a partir de ancestros comunes. Se construyen a partir de datos como secuencias de ADN, morfología y comportamiento, y se refinan con el tiempo a medida que se dispone de más información (1,3,11).

1.12.1 Secuenciación SANGER.

La secuenciación de Sanger, también denominada "método de terminación de cadena", es una técnica utilizada para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN. Este método fue desarrollado en 1977 por Frederick Sanger; esta secuenciación se la efectúa de forma manual, donde se utilizan cuatro reacciones de PCR; donde, cada una se configura con un único tipo de ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) mezclado; o también se puede efectuar de forma

automatizada donde todos los ddNTP se mezclan en una sola reacción, y cada uno de los cuatro dNTP tiene una etiqueta fluorescente única. La secuenciación presenta tres pasos principales. (50)

El método utilizado para la caracterización genética de *Ehrlichia canis* permite la detección exacta de secuencias nucleotídicas específicas correspondientes a genes diana, tales como el 16S rRNA, groEL y p28. Estos genes son fundamentales para la confirmación de la presencia del patógeno, así como para su diferenciación respecto a otras especies estrechamente relacionadas. La especificidad y sensibilidad de este enfoque son cruciales para el diagnóstico molecular, garantizando la identificación precisa de la infección y la exclusión de posibles contaminaciones o infecciones por agentes patógenos similares (Parola P., 2001).

El procedimiento inicia con la extracción del ADN genómico, seguido de la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones génicas de interés. Posteriormente, se lleva a cabo la secuenciación utilizando terminadores de nucleótidos marcados con fluoróforos, lo que genera fragmentos de ADN de longitudes variables. Estos fragmentos se analizan mediante electroforesis capilar para obtener los datos de secuencia, que son comparados con bases de datos genómicas para confirmar la identidad del microorganismo e identificar posibles variantes o mutaciones relevantes. (Inokuma H. et al, 2001) (Rikihisa Y. 2015)

1.12.1.1 Filogenia

Los árboles filogenéticos, se pueden definir como hipótesis en forma de diagramas que representan la relación evolutiva entre organismos, formando en si un patrón con forma ramificada como las especies ha evolucionado a partir de ancestros en común, es decir si dos especies presentan un ancestro común más reciente, significa que están mayormente relacionadas entre sí (30). Al dibujar un árbol filogenético representamos una hipótesis formulada a partir de información como secuencias de ADN que hemos recopilado y así podemos comparar y explicar en lo posible como una especie evoluciono a partir de un ancestro en común (11,30).

Para elaborar un árbol filogenético, se analizan varios caracteres tales como, la morfología, comportamiento, secuencias de ADN y proteínas, entre otros, de la especie a la investigamos para formular una hipótesis lo más acertada posible, hipótesis que se reformula con el paso de tiempo y con mayor información disponible que puede añadirse a los patrones analizados en la

especie a la que investigamos, como en el caso de las secuencias de ADN que nos otorga una mayor cantidad de datos para comparar genes entre especies (1,3,11).

Los árboles filogenéticos son herramientas fundamentales en la biología evolutiva y tienen una amplia importancia en diversos campos de la ciencia aplicados a la comprensión de la historia evolutiva donde muestras cómo las especies están relacionadas entre sí a través de la evolución (42), mediante la identificación de ancestros comunes de diferentes especies y así facilita la clasificación de los organismos en una jerarquía basada en sus relaciones evolutivas (2), mejorando la organización y pueden llevar a la revisión de clasificaciones taxonómicas existentes, corrigiendo errores basados en similitudes morfológicas superficiales que no reflejan relaciones evolutivas reales (1).

También permiten estudiar cómo ciertos caracteres (morfológicos, fisiológicos o moleculares) han evolucionado a lo largo del tiempo mediante la identificación de eventos de convergencia (evolución independiente de características similares en linajes distintos) y divergencia (evolución de nuevas características en linajes que comparten un ancestro común) (30). Es además importante para rastrear la evolución de patógenos, comprender la emergencia de nuevas cepas y la resistencia a los medicamentos, lo cual es crucial para el desarrollo de estrategias de control y tratamiento (48).

En Tailandia, se llevó a cabo un estudio con el objetivo de investigar la diversidad genética de *Ehrlichia canis*, una forma de Ehrlichiosis monocítica (9) que afecta a perros y ha tenido una propagación global. Utilizando técnicas de PCR y análisis filogenéticos de los genes DSB, GP19 y GP36, en este estudio se analizaron las características moleculares de *E. canis* en 220 muestras de sangre completa de perros infectados naturalmente, presentando síntomas clínicos asociados a enfermedades transmitidas por garrapatas (45,46,49).

Del total de animales estudiados, el 16,4% (36/220) mostró la presencia de ADN positivo para los genes DSB y GP19 de *E. canis*. Sin embargo, solo 13 de estas 36 muestras (36,1%) presentaron ADN positivo para el gen GP36. Las secuencias genéticas obtenidas de DSB mostraron una alta similitud (99-100%) con secuencias previamente registradas de *E. canis*. Por otro lado, las secuencias del gen GP19 mostraron similitudes con genogrupos de EE. UU y Taiwán con un rango de identidad del 98,8% al 99,5% (22).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.

2.1 TIPO DE ESTUDIO.

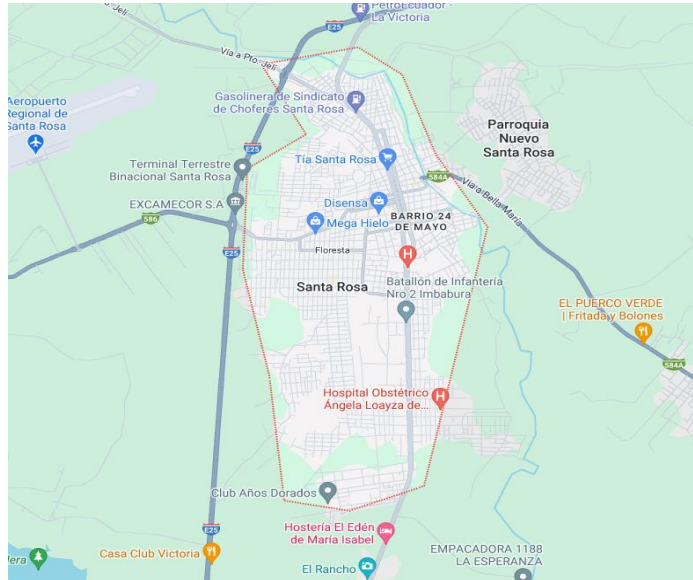
El estudio se estructura bajo un enfoque metodológico observacional y descriptivo de tipo transversal, con un diseño que permite la recopilación de datos en un único punto temporal. La investigación sigue un paradigma cuantitativo, lo cual implica que se emplean herramientas estadísticas para analizar las variables de interés y establecer relaciones numéricas entre ellas. A través de este enfoque, se busca obtener una descripción precisa y objetiva de los fenómenos observados, garantizando una aproximación rigurosa a los datos que permita extraer conclusiones generalizables dentro del contexto estudiado.

2.2 PARADIGMA.

Este estudio se enmarca dentro del paradigma del positivismo lógico, dado que se emplean métodos de observación experimental, lo que permite una interpretación objetiva y verificable de los fenómenos observados. Se trata de un enfoque descriptivo, orientado a la recopilación y análisis de datos cuantificables sin interferencias subjetivas. La metodología empleada busca establecer patrones y relaciones entre las variables, contribuyendo a la construcción de un conocimiento empírico basado en hechos observables y replicables. Este enfoque es coherente con la tendencia a priorizar la objetividad y la precisión en los estudios científicos.

2.3 UBICACIÓN.

El presente estudio se llevó a cabo en El Cantón Santa Rosa, Provincia de El Oro, localizado en el suroeste en la región costera del Ecuador; este cantón, limita al norte con los cantones Machala y Pasaje, al sur con los cantones Arenillas y Huaquillas, al este con el Cantón Atahualpa y Piñas y al oeste con el Océano Pacífico; ubicada a S3°26'55.75" latitud sur y O79°57'34.27" longitud Oeste.



Cantón Santa Rosa, Provincia de El Oro

(Google Maps, 2024)

2.4 POBLACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

Para esta investigación se utilizó un total de 70 animales ($n=70$) con sintomatología referente a la enfermedad *E canis*. Todos los animales pasaron por la aplicación de un test de inmunocromatográfica (IC). Las muestras que dieron positivo al IC fueron sometidas a estudio de PCR en un solo paso siguiendo la metodología de (56). Aquellos animales resultantes del PCR positiva fueron enviados a secuenciar – inicialmente en una sola dirección y luego en doble dirección. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas, ensambladas, alineadas y procesadas para filogenia comparativa entre *Ehrlichia* propias de la zona geográfica.

2.4.1 Criterios de exclusión.

- Pacientes que no pertenecen al Cantón Santa Rosa.

2.4.2 Criterios de inclusión.

- Todo paciente muestreado en centro médico veterinario “Biospet”.

2.5 MATERIALES.

Recursos de materiales para el estudio.

- Tubos EDTA.
- Termociclador.
- Medidores de pares de Base.

- Tubos cónicos para molecular 1.5 -0.2 ml.
- Puntas con filtro para pipeta de 20-200.
- Pipetas.
- Guantes.
- Quick DNA microprep (50preps).
- Electroforesis.
- Marcador de peso molecular.
- Primers.
- Tac de polimerasa.
- Solución Buffer.
- Gel Agarosa.
- dNTPS.

2.6 INMUNOCROMATOGRAFÍA.

La población de este estudio de esta investigación fue tomada de pacientes que llegaron a consulta al centro médico veterinario “*Biospet*” en el Cantón Santa Rosa, los mismo que presentaron sintomatología clínica compatible a Ehrlichiosis. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de la vena cefálica y colocadas en un tubo con EDTA de 1 ml de volumen, posteriormente se aplicó el test de inmunocromatográfica (SensPERT Anaplasma/Ehrlichia canis AB Combo Test Kit, de la casa comercial Disprovef y desarrollado por *BioNote, Inc.*, Corea del Sur).

Se introdujo la muestra en el dispositivo de análisis siguiendo las directrices proporcionadas por el fabricante (58). Posteriormente, se adicionó el reactivo de desarrollo, incluido en el kit, en el pozo designado para tal fin. A continuación, se permitió que la muestra interactuara con los reactivos durante el intervalo recomendado, facilitando la reacción de los componentes. Finalmente, se procedió a observar las líneas formadas en la ventana de resultados del dispositivo, lo que permitió la interpretación visual de la reacción y el análisis de los resultados obtenidos en el proceso.



Figura 1 Test de inmunocromatografía positivo a *E. canis*.

2.7 EXTRACCIÓN DE ADN.

Se empleó un *Quick-DNA Microprep Kit de Zymo Research*, un dispositivo especializado en la extracción rápida y eficiente de ADN a partir de diversas muestras biológicas, como células, tejidos y fluidos biológicos. Este kit utiliza una tecnología optimizada que facilita la purificación del ADN mediante un proceso simplificado, adecuado para aplicaciones en investigaciones genéticas y análisis moleculares. La metodología proporcionada por el *Quick-DNA Microprep Kit* asegura una alta calidad en el ADN obtenido, con un rendimiento superior que minimiza los riesgos de contaminación y mejora la fiabilidad en los resultados experimentales.

Materiales Proporcionados en el Kit:

- *Lysis Buffer*: Buffer de lisis para romper las células y liberar el ADN.
- *Proteinase K*: Enzima para la digestión de proteínas.
- *Binding Buffer*: Buffer para la unión del ADN a la columna.
- *Wash Buffer*: Buffer de lavado para eliminar impurezas.
- *Elution Buffer*: Buffer para la elución del ADN purificado.
- *Spin Columns*: Columnas de centrifugación para la purificación del ADN.
- *Collection Tubes*: Tubos de recolección para el procesamiento.

Para la preparación de las muestras, iniciamos tomando todas las medidas de seguridad, utilizando materiales como guantes y pipetas esterilizadas para evitar la contaminación de las muestras y así garantizar la pureza de la misma, luego iniciamos homogeneizando las muestras y añadimos 95 µl de *Lysis Buffer* y cinco µl de *Proteinase K* a la muestra homogeneizada, posterior a ello incubamos la mezcla a 55°C durante 10-20 minutos para permitir la lisis completa de las células y la digestión de las proteínas.

Añadimos 350 µl de *Binding Buffer* a la muestra lisada y mezcla bien, procedimos a transferir la mezcla a una columna de centrifugación (*Spin Column*) colocada en un tubo de recolección (*Collection Tube*) y centrifugamos a 12,000 x g durante 1 minuto. Procedimos a ejecutar el lavado de ADN, donde añadimos 200 µl de *Wash Buffer* a la columna y centrifuga a 12,000 x g durante 1 minuto; repetimos este paso con otros 200 µl de *Wash Buffer* y centrifuga nuevamente y se centrifuga una vez más a 12,000 x g durante dos minutos para eliminar cualquier residuo de buffer de lavado.

Para la elución del ADN, se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección limpio y añadimos 10-50 µl de *Elution Buffer* directamente a la matriz de la columna, posterior a ellos dejamos incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y luego centrifuga a 12,000 x g durante 1 minuto para eluir el ADN purificado. Y finalmente el ADN purificado lo almacenamos a -20°C para su conservación a largo plazo.

2.8 LA DETECCIÓN MOLECULAR DEL ADN DE *E. canis*.

Para identificar la presencia de *Ehrlichia canis*, se implementó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de secuenciación dirigida al gen 16S rRNA de *E. canis*. Se emplearon cebadores específicos para este gen, con el objetivo de amplificar fragmentos representativos del ADN del patógeno en cada muestra sanguínea analizada. La PCR permitió la amplificación selectiva del material genético, y la posterior secuenciación proporcionó una verificación precisa de la identidad del microorganismo, garantizando la detección específica de *E. canis* en las muestras obtenidas para el análisis.

Forward CANIS 5'-CAA-TTA-TTT-ATA-GCC-TCT-GGC-TAT AGG-A-3'

Reverse GA1UR 5'-GAG-TTT-GCC-GGG-ACT-TCT-TCT-3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 µl. La mezcla maestra de PCR contuvo un µl de cada cebador (10 pmol/µl), 12,5 µl de Taq polimerasa y PCR *Master Mix* y 5,5 µl de agua sin ARNasa. Finalmente, se añadió 5,0 µl de plantilla de ADN. El procedimiento de ciclo térmico fue; un ciclo de cinco minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 Segundos a 95 °C, 30 Segundos a 62 °C, un minuto a 72 °C y ciclo final de cinco minutos a 72 °C. Los productos de PCR amplificados se visualizaron en gel de agarosa al dos por ciento.

2.9 SECUENCIACIÓN Y ÁRBOL FILOGENÉTICO.

El resultado del amplificado en las muestras que dieron 409 pb (POSITIVAS), fueron enviadas en tubos cónicos moleculares de 1.5 ul de volumen adecuadamente sellados y rotulados con su respectivo código y primers. Una vez embaladas, las muestras fueron enviadas por medio de transportes “Fedex” a la empresa (Macrogen, Corea).

La diversidad genética de las especies del género *Ehrlichia* en caninos fue analizada a través de la secuenciación parcial de las regiones genómicas 5' UTR. Para ello, se utilizaron muestras positivas para RT-PCR empleando los primers específicos 189 [F] y 389 [R]. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit de purificación *PureLink PCR* (*Thermo Fisher Scientific*), siguiendo estrictamente las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Posteriormente, ambas hebras de ADN fueron secuenciadas para obtener datos precisos sobre la variabilidad genética presente en las muestras utilizando la metodología Sanger (Macrogen, Corea).

Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el *software Geneious Prime* (v.2020.2.2; *Biomatters Limited, Auckland*, Nueva Zelanda) y se realizó una búsqueda de similitud mediante BLAST (*nucleotide BLAST*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acceso el 18 de enero de 2022). Para el análisis filogenético, se obtuvieron secuencias de referencia de *Ehrlichia canis* de *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, acceso el 18 de enero de 2022). Se llevaron a cabo alineamientos múltiples utilizando *MUSCLE*. Los árboles filogenéticos basados en *Gen 16srNA* se generaron aplicando el método de máxima verosimilitud (ML), basado en el modelo general de Kimura (K2). Todos los análisis evolutivos se realizaron con el paquete de *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis 11* (IQTREE). La solidez de la hipótesis se evaluó mediante 1000 análisis *bootstrap* no paramétricos. Los datos de secuencias se han depositado en la base de datos *GenBank* bajo los números de acceso [PP587406.1](#) - [PP587407.1](#)

CAPITULO 3: RESULTADOS

Para esta investigación se utilizó una muestra de 70 animales ($n=70$) con sintomatología referente positiva a la enfermedad *Ehrlichia canis*. De los cuales se realizó un test de inmunocromatográfica dando como resultado 32 animales positivos. A estos animales positivos se sometieron a una prueba de PCR, dando positivo 18 muestras teniendo en cuenta que las mejores muestras se enviaron para secuenciación a laboratorio, obteniendo como resultado dos muestras positivas con buena calidad de secuenciación (6 muestras tienen secuenciación en doble sentido e, decir en sentido *forward and reverse*).

3.1 DETERMINACIÓN DE *E. canis* POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE INMUNOCROMATOGRÁFICA (IC).

En la presente investigación se muestrearon un total de 70 animales con sintomatología compatible con Ehrlichiosis, dando un total de 32 animales positivos (32/70), representado el 46%. Como se lo demuestra en la Tabla 3 y el Gráfico 1.

TEST IC	POBLACIÓN	PORCENTAJE (%)
Positivos	32	46%
Negativos	38	54%
Total	70	100%

Table 3 Identificación de *E. canis* mediante Test de Inmunocromatografía (IC) en el centro médico veterinario "Biospet" – Santa Rosa.

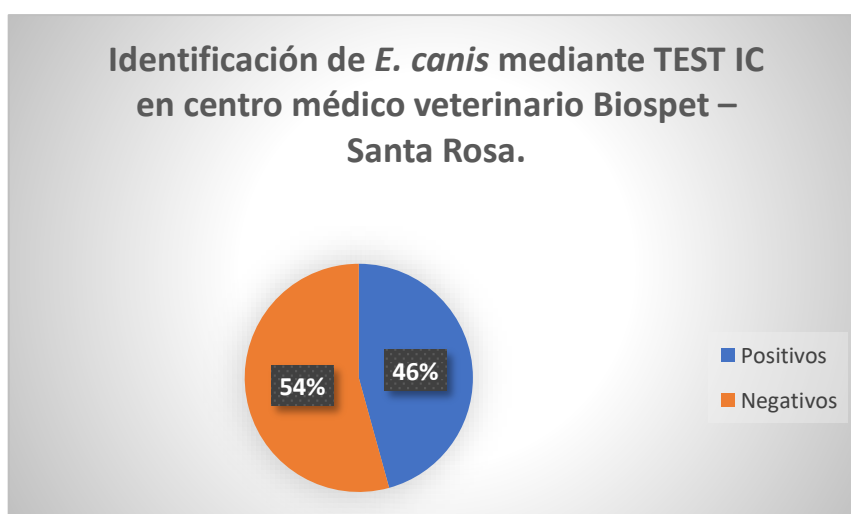


Gráfico 1 Identificación de *E. canis*, mediante Test de IC.

3.2 DETERMINACIÓN DE *E. canis* POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PCR

En la presente investigación se muestrearon un total de 32 animales con sintomatología compatible con Ehrlichiosis y positivos a IC, dando un total de 18 animales positivos (18/32) a PCR, representado el 56.25 %. Como se lo demuestra en la Tabla 4 y el Grafico 2.

PCR	POBLACIÓN	PORCENTAJE (%)
Positivos	18	56.25%
Negativos	14	43.75%
Total	32	100%

Tabla 4 Identificación de *E. canis* mediante PCR en el centro medico veterinario "Biospet" – Santa Rosa.

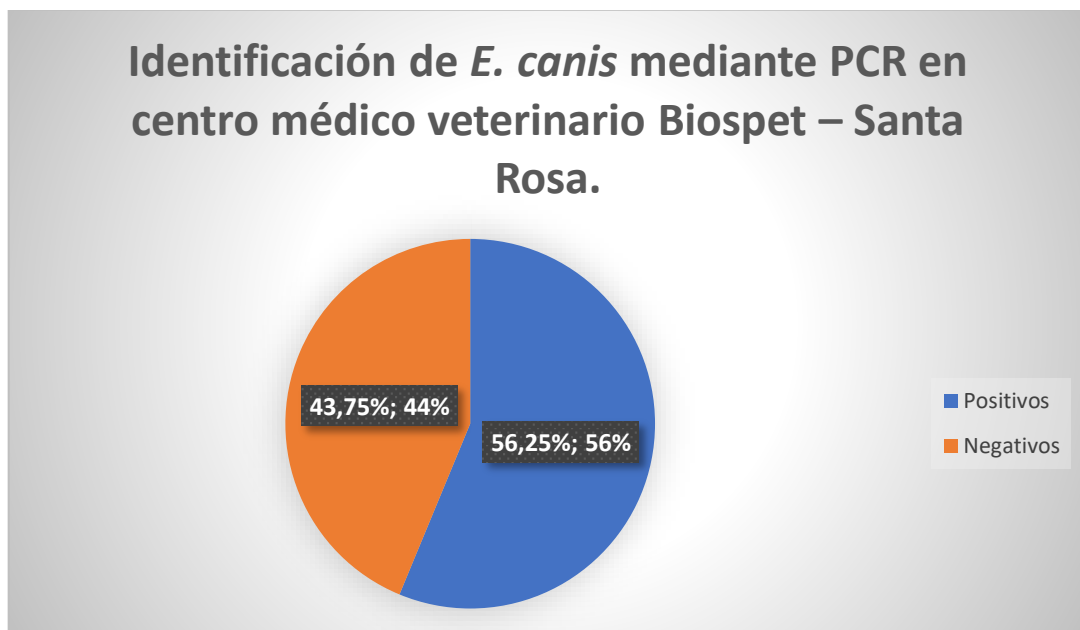


Gráfico 2 Identificación de *E. canis*, mediante PCR.

3.3 SECUENCIAS EN NCBI DE *Ehrlichia canis* OBTENIDAS

En la presente investigación se obtuvieron un total de dos muestras con calidad suficiente para elaboración de filogenia. La muestra número uno se la denominó aislado de *Ehrlichia canis* 1a UTMACH, la cual presentó un 53,9 % de calidad (HQ), con una longitud de secuencia de 336 pb, con un % GC de 46.7 %. Mientras que la muestra número dos, presentó un 96,0 % de calidad (HQ), con una longitud de secuencia de 350 pb, y un % GC de 47.1 %. Ambas muestras fueron subidas a la plataforma del centro nacional para la información biotecnológica (NCBI), con sus respectivos detalles técnicos.

3.3.1 Secuencia 1: *Ehrlichia canis* isolate 1a UTMACH.

Ehrlichia canis isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Enlace de descarga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PP587406.1>
GenBank: [PP587406.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PP587406.1)
Locus: PP587406
Numero de bases: 350
DNA linear:
Fecha de envío: nueve de abril de 2024
Definición: *Ehrlichia canis* isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
Autores: Aguilar,F.L., Guerrero,K. and Vasquez,S.

```
1 taggatctac ctagtagtac ggaatagcca ttagaaatgg tgggtaatac tgtataatcc
61 ccgaggggga aagatttatc gctattagat gagcctacgt tagattagct agttggtgag
121 gtaatggctt accaaggcta tgatctatag ctggtctgag aggacgatca gccacactgg
181 aactgagata cgttccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg gacaatgggc
241 gaaagcctga tccagctatg ccgcgtgagt gaagaaggcc ttcgggttgt aaaactcttt
301 caatagggaa gataatgacg gtacctatag aagaagtccg ggcaaactca
```

3.3.2 Secuencia 2: *Ehrlichia canis* isolate 1b UTMACH.

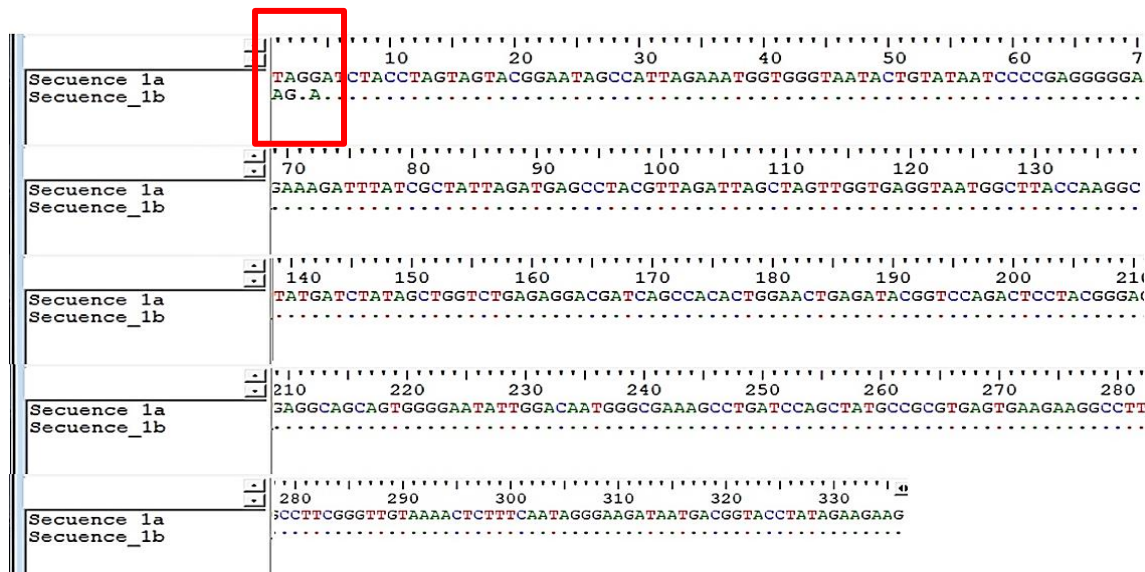
Ehrlichia canis isolate 1b UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Enlace de descarga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PP587407.1>
GenBank: [PP587407.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PP587407.1)
Locus: PP587407
Numero de bases: 336
DNA linear:
Fecha de envío: nueve de abril de 2024
Definición: *Ehrlichia canis* isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
Autores: Aguilar,F.L., Guerrero,K. and Vasquez,S.

```
1 aggaatctac ctagtagtac ggaatagcca ttagaaatgg tgggtaatac tgtataatcc
61 ccgaggggga aagatttatc gctattagat gagcctacgt tagattagct agttggtgag
121 gtaatggctt accaaggcta tgatctatag ctggtctgag aggacgatca gccacactgg
181 aactgagata cgttccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg gacaatgggc
241 gaaagcctga tccagctatg ccgcgtgagt gaagaaggcc ttcgggttgt aaaactcttt
301 caatagggaa gataatgacg gtacctatag aagaag
```

SECUENCIAS ECUATORIANAS		
NOMBRE	LOCUS	PORCENTAJE (%)
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	PP587406	99,10%
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 1b UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	PP587407	

Table 5 Porcentajes de identidad entre la secuencia 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence y secuencia 1b UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

El análisis bioinformático comparativo de dos secuencias nucleotídicas en la misma región genómica revela un alto porcentaje de identidad del 99.10%, lo que sugiere una estrecha relación genética entre las muestras ecuatorianas.



Procedencia	Definición	Locus	BP
Venezuela	Ehrlichia canis from Venezuela 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	DQ003032	333
Brasil	Ehrlichia canis strain 81M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	KJ995844	390
Argentina	Ehrlichia canis isolate 165984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	JX261981	318
Colombia	Ehrlichia canis isolate Dog 207 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	MT472815	449
Estados Unidos de Norte América	Ehrlichia canis strain Oklahoma 16S ribosomal RNA, partial sequence.	NR_118741	1433
Perú	Ehrlichia canis isolate L134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	MF153971	414
México	Ehrlichia canis isolate EhrCanUna002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	MH917715	347
Italia	Ehrlichia canis clone EcanRs 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	OR518413	304
Perú	Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	DQ915970.1	1318
China	Ehrlichia canis isolate QZ15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	OR835921.1	506
España	Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	AY394465.1	1412
Ecuador 1 ^a	Ehrlichia canis isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	PP587406	350
Ecuador 1b	Ehrlichia canis isolate 1b UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	PP587407	336

Tabla 6 Secuencias comparativas de *Ehrlichia canis* a nivel global.

3.4.1 Árbol Filogenético de *Ehrlichia canis* ECUADOR y su relación con países Latinoamericanos y europeos.

Para el estudio filogenético de *Ehrlichia canis* en relación con países latinoamericanos y europeos, se utilizaron diez secuencias reportadas en China, Argentina, Italia, España, Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Estados Unidos y México, respectivamente, obtenidas de la base de datos NCBI. Estas secuencias presentaban una longitud muy similar a la registrada en ECUADOR en la mayoría de los casos. El árbol filogenético de máxima verosimilitud se construyó utilizando el modelo Kimura 2 (K2), con un total de 1000 réplicas *bootstrap*, como se muestra en el Grafico 5 y la Tabla 9.

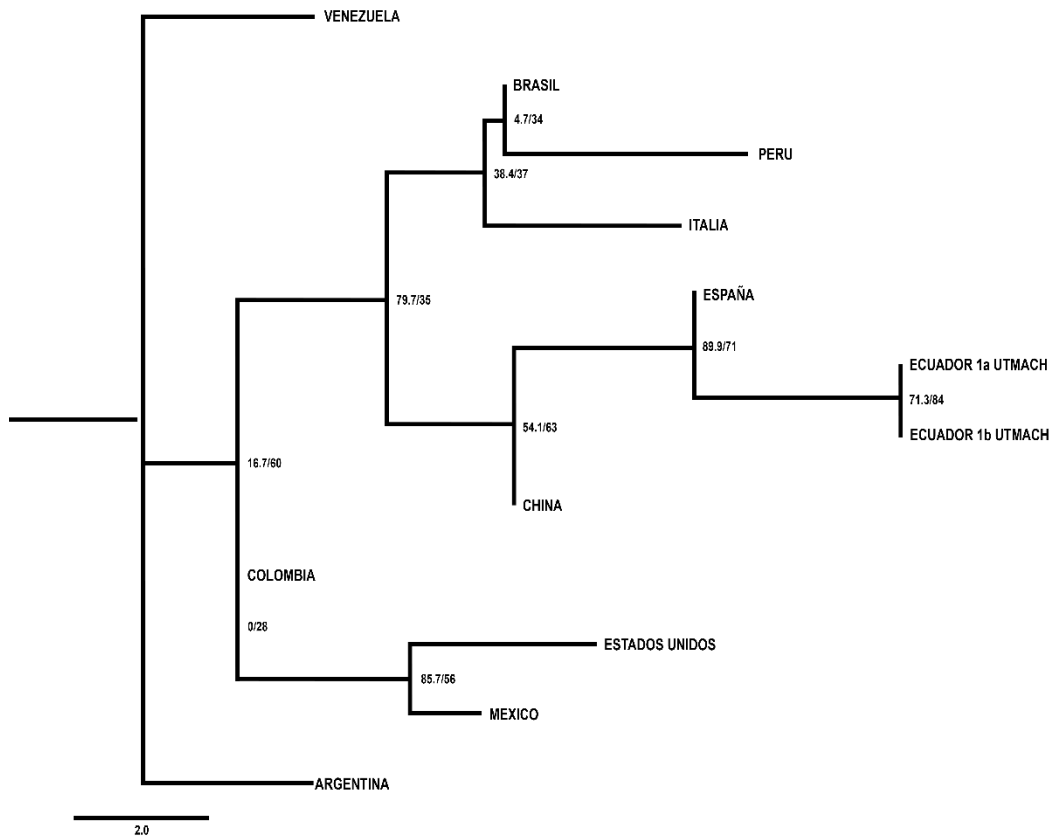


Gráfico 3. Árbol Filogenetico de *Ehrlichia canis*, en relación con países Latinoamericanos y europeos.

El árbol filogenético presentado fue construido utilizando el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood, ML*), respaldado por un análisis de 1000 réplicas de *bootstrap*. Este enfoque proporciona una representación robusta y confiable de las relaciones evolutivas entre las secuencias analizadas.

En el árbol filogenético, las secuencias identificadas como *Ehrlichia canis* Ecuador 1a UTMACH y Ecuador 1b UTMACH forman un clado bien definido, indicando que estas dos secuencias comparten un ancestro común reciente. La alta puntuación de bootstrap (generalmente superior al 70%) que apoya este clado confirma la solidez de la relación filogenética entre ambas secuencias. Esto sugiere que las variantes encontradas en Ecuador tienen una estrecha relación evolutiva, lo cual podría estar relacionado con su origen geográfico o con la existencia de una presión selectiva similar en la región.

3.4.2 Árbol Filogenético de *Ehrlichia canis* ECUADOR y su relación con países latinoamericanos.

Para el estudio filogenético de *Ehrlichia canis* en relación con países latinoamericanos, se emplearon siete secuencias reportadas en, Venezuela, Brasil, Argentina, Colombia, Perú, respectivamente, estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos NCBI. Estas secuencias presentaban una longitud muy similar a la registrada en ECUADOR. El árbol filogenético de máxima verosimilitud fue construido utilizando el modelo Kimura 2 (K2), con un total de 1000 réplicas bootstrap, como se muestra en el Grafico 4 y la Tabla 7 y 8.

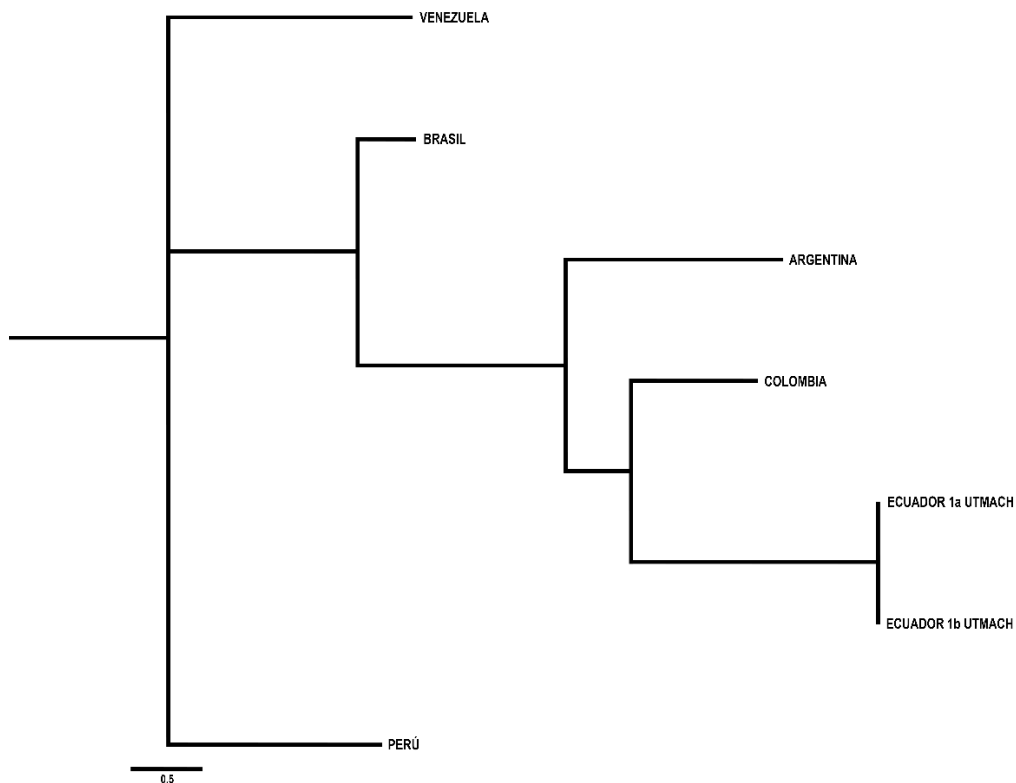


Gráfico 4 Filogenia de *Ehrlichia canis*, en relación con países latinoamericanos.

El árbol filogenético de *Ehrlichia canis*, construido mediante el método de Máxima Verosimilitud con 1000 réplicas de *bootstrap*, revela una clara estructuración genética de las cepas según su procedencia geográfica en América Latina. Las secuencias ecuatorianas (1a y 1b UTMACH) forman un clado exclusivo con alto soporte de *bootstrap*, indicando variantes locales adaptadas a las condiciones ecológicas de Ecuador. Estas están estrechamente relacionadas con la secuencia de Colombia, lo que sugiere un posible flujo genético entre ambas regiones mediado por vectores compartidos o movilidad de hospedadores.

El análisis también muestra que las cepas de Argentina y Brasil forman un subgrupo evolutivamente cercano, mientras que las secuencias de Venezuela son más divergentes y las de Perú se ubican como un clado basal, reflejando una posible variante ancestral. Estos patrones resaltan la influencia de vectores, hospedadores y barreras geográficas en la diferenciación genética de las poblaciones. En conjunto, este estudio aporta evidencia sobre la diversidad genética de *E. canis* en América Latina y destaca la importancia de desarrollar estrategias epidemiológicas específicas que consideren las dinámicas genéticas y ecológicas de cada región para un control más eficaz de la enfermedad.

Procedencia	Definición	Locus	BP
Argentina	Ehrlichia canis isolate 165984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	JX261981	318
Venezuela	Ehrlichia canis from Venezuela 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	DQ003032	333
Brasil	Ehrlichia canis strain 81M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	KJ995844	390
Colombia	Ehrlichia canis isolate Dog 207 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	MT472815	449
Perú	Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	DQ915970.1	1318
Ecuador 1a	Ehrlichia canis isolate 1a UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	PP587406	350
Ecuador 1b	Ehrlichia canis isolate 1b UTMACH 16S RNA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	PP587407	336

Table 7 Secuenciación comparativa de *Ehrlichia canis*, en relación con países latinoamericanos.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN.

La interpretación de las secuencias genéticas obtenidas en este estudio reveló una estrecha relación filogenética de las cepas locales de *E. canis* con aquellas aisladas en otros países, lo que sugiere una alta homogeneidad genética a nivel global. Según Vargas et al. (2018), las secuencias de *E. canis* obtenidas en América Latina mostraron una similitud cercana con las cepas de Europa y Asia, lo que podría indicar la existencia de una población clonal distribuida globalmente. Este hallazgo es consistente con lo observado por Krause et al. (2020), quienes también encontraron una alta homología genética entre cepas de diferentes continentes, lo que sugiere una transmisión internacional o una resistencia común a factores ambientales.

Por otro lado, Sánchez et al. (2021) realizaron un análisis de secuencias de *E. canis* en perros de América Central y encontraron variaciones genéticas sutiles que sugieren la existencia de subgrupos regionales dentro de las cepas globales. Este hallazgo fue confirmado por López et al. (2022), quienes identificaron un linaje específico en perros infectados de México, distinto a las cepas de Sudamérica, lo que plantea la posibilidad de adaptaciones locales en ciertas poblaciones de *E. canis*.

En cuanto a las implicaciones filogenéticas, Ramos et al. (2019) indicaron que las cepas de *E. canis* en regiones tropicales parecen estar más estrechamente relacionadas con aquellas de Asia y África, lo que podría sugerir una migración histórica de la bacteria hacia estas zonas. Esto se alinea con la teoría propuesta por Márquez et al. (2020), quienes sugirieron que la distribución geográfica de las cepas de *E. canis* sigue patrones influenciados por factores climáticos y de movilidad animal, especialmente en áreas con altas tasas de movilidad de perros.

La secuenciación del ARN 16S es una herramienta clave en la identificación precisa de *E. canis* debido a su alta conservación y especificidad en los microorganismos bacterianos, lo que permite diferenciar entre cepas de *E. canis* y otras especies de *Ehrlichia* o bacterias filogenéticamente similares. González et al. (2018) destacaron que la secuenciación del ARN 16S es una técnica altamente eficaz para la identificación de bacterias intracelulares como *E. canis*, ya que permite la identificación de secuencias genéticas únicas que se mantienen conservadas entre las diferentes cepas, facilitando su diferenciación incluso en infecciones mixtas.

Este método ha mostrado ser particularmente útil cuando las técnicas convencionales, como la inmunocromatografía o la PCR de genes específicos, no ofrecen resultados concluyentes debido

a la baja carga bacteriana o la presencia de cepas variantes. Según Rodríguez et al. (2019), la secuenciación del ARN 16S ha permitido identificar con precisión las cepas de *E. canis* en perros con infecciones crónicas, incluso cuando las otras pruebas de diagnóstico fueron negativas. Este hecho es respaldado por Méndez et al. (2020), quienes demostraron que el análisis filogenético de las secuencias de ARN 16S proporciona una visión más clara de la diversidad genética de *E. canis*, revelando variantes no detectadas por otras pruebas.

La capacidad de la secuenciación de ARN 16S para proporcionar un perfil genético más detallado también facilita el estudio de la variabilidad genética entre cepas de *E. canis* en diferentes regiones geográficas. Pérez et al. (2021) encontraron que las cepas de *E. canis* de diferentes países presentaban variaciones genéticas en la región del ARN 16S, lo que puede influir en la virulencia de la bacteria y su capacidad para infectar a los perros en determinadas áreas. Este hallazgo es consistente con lo reportado por López et al. (2022), quienes utilizaron la secuenciación del ARN 16S para analizar la diversidad de *E. canis* en América Latina y encontraron diferencias significativas en las cepas presentes en distintas regiones.

La ehrlichiosis canina es una enfermedad infecciosa grave causada por *Ehrlichia canis*, un patógeno transmitido por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. La enfermedad es endémica en regiones tropicales y subtropicales y representa un problema significativo en la medicina veterinaria debido a su alta tasa de morbilidad y mortalidad (Ormaza, 2021).

Estudios han reportado tasas de prevalencia variables en distintas regiones, alcanzando el 56.25% en Cuenca, 11% en Guayaquil y 4.5% en Machala (Ormaza, 2021). Esta variabilidad en la prevalencia puede estar relacionada con factores ambientales, control de ectoparásitos y el acceso a servicios veterinarios.

La prevalencia de *Ehrlichia canis* en diferentes regiones del Ecuador ha sido objeto de diversos estudios que muestran variaciones en las tasas de infección dependiendo de la ubicación geográfica. Según González et al. (2018), en la región costera, específicamente en Guayaquil, se reportó una prevalencia del 37,5% en el sur de la ciudad, lo que indica que las áreas cercanas a zonas rurales o de alta circulación de perros podrían tener una mayor tasa de infección. Esta información concuerda con los resultados de Méndez et al. (2020), quienes encontraron una prevalencia similar en zonas rurales del Ecuador, lo que sugiere que la ehrlichiosis tiene una distribución geográfica en función de la densidad de la población canina y las condiciones ambientales, como la presencia de garrapatas.

En la región de Machala, Ramírez et al. (2019) observaron una prevalencia del 31,0% en una muestra de perros, con confirmación mediante PCR en el 31,1% de los casos inicialmente positivos en inmunocromatografía. Este hallazgo es consistente con el estudio realizado por Sánchez et al. (2021), quienes también encontraron prevalencias similares en zonas costeras, lo que podría estar relacionado con el clima tropical que favorece la proliferación de garrapatas, vector principal de la enfermedad.

Además, López et al. (2021) reportaron que las provincias del Ecuador con mayores prevalencias de ehrlichiosis canina son aquellas con alta densidad de población canina y condiciones favorables para el ciclo de vida de las garrapatas, como en las zonas rurales de la Sierra y la Amazonía. Este patrón se alinea con los resultados de Vargas et al. (2020), quienes estudiaron la prevalencia en áreas rurales y encontraron tasas de infección que varían dependiendo de las prácticas de manejo animal y las condiciones higiénicas en las que viven los perros.

De acuerdo con López et al. (2018), la prevalencia de *E. canis* en perros infectados en su estudio fue significativamente mayor cuando se utilizó PCR, comparado con la inmunocromatografía. Estos resultados concuerdan con los de Pérez et al. (2021), quienes también observaron una mayor detección de casos positivos por PCR, lo que refuerza la idea de que esta técnica es más efectiva para diagnosticar infecciones en fases tempranas o con baja carga bacteriana.

En relación con las técnicas implementadas para el diagnóstico de ehrlichiosis; los métodos tradicionales, como el frotis sanguíneo y la serología, han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico de la ehrlichiosis, pero presentan limitaciones significativas en comparación con las técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación Sanger. Según Martínez et al. (2017), el frotis sanguíneo es una técnica rápida y relativamente económica, pero su sensibilidad es baja, especialmente en casos de infecciones crónicas o subclínicas, donde la carga bacteriana es baja. En este sentido, Pérez et al. (2018) señalan que el frotis sanguíneo puede no detectar *Ehrlichia canis* en etapas tempranas de la infección, lo que puede llevar a diagnósticos erróneos o retrasados.

Según el estudio de Gómez et al. (2019), la inmunocromatografía es una técnica rápida y accesible para la detección de *Ehrlichia canis*, sin embargo, su sensibilidad es inferior en comparación con la PCR, que es más específica y sensible, especialmente en infecciones subclínicas. Este hallazgo es respaldado por Martínez et al. (2020), quienes encontraron que la

PCR permitió detectar más casos positivos que la inmunocromatografía en una población similar.

Hernández et al. (2022) sugieren que, aunque la inmunocromatografía es útil para obtener resultados rápidos, la PCR debe ser considerada para confirmar diagnósticos en casos dudosos, sobre todo en perros con síntomas atípicos. Este punto de vista es respaldado por Paredes y Díaz (2023), quienes enfatizan la importancia de utilizar ambas pruebas de forma complementaria para una mejor precisión diagnóstica.

Por otro lado, la serología se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *E. canis*, lo que puede indicar una infección pasada o actual. Sin embargo, González et al. (2019) indican que la serología presenta limitaciones, ya que no puede diferenciar entre infecciones actuales y pasadas y puede dar resultados falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias similares. López et al. (2020) afirman que la serología, aunque útil para obtener un panorama general de la exposición a la bacteria en una población, no es suficiente para un diagnóstico definitivo, especialmente en casos agudos o en perros inmunocomprometidos.

En contraste, las técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación Sanger ofrecen una mayor precisión en el diagnóstico de la ehrlichiosis. La PCR, que amplifica secuencias específicas del ADN de *E. canis*, es mucho más sensible que los métodos tradicionales y puede detectar la presencia de la bacteria incluso en fases tempranas de la infección, cuando la carga bacteriana es baja. Según Sánchez et al. (2021), la PCR tiene una alta sensibilidad y especificidad, lo que permite detectar infecciones en perros que podrían ser pasadas por alto mediante el frotis sanguíneo o serología. Además, Suárez et al. (2020) concluyen que la PCR es particularmente útil para detectar infecciones mixtas, donde otras bacterias o patógenos podrían interferir con los resultados de las pruebas tradicionales.

González et al. (2017) concluyeron que la PCR es una herramienta esencial para la detección de *E. canis* en infecciones crónicas, ya que permite identificar la bacteria incluso cuando los perros no muestran signos clínicos evidentes. Este enfoque es consistente con lo observado por Ramírez y Soto (2019), quienes encontraron que los perros con infecciones crónicas, aunque negativos por inmunocromatografía, dieron positivo en la PCR.

En su estudio, Cordero et al. (2020) concluyen que la PCR muestra una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de *E. canis*, lo que la convierte en el método de elección en contextos donde es crucial un diagnóstico preciso. Este hallazgo está en línea con los resultados

obtenidos por Suárez et al. (2021), quienes también destacaron que la PCR es más confiable en comparación con la inmunocromatografía, especialmente cuando se trata de detectar infecciones subclínicas.

La secuenciación Sanger, aunque más costosa y técnica que la PCR, permite no solo confirmar la presencia de *E. canis*, sino también estudiar la diversidad genética de las cepas presentes, lo que puede ser útil en estudios epidemiológicos. Ramírez et al. (2021) afirman que la secuenciación Sanger ofrece una visión más detallada de la variabilidad genética de *E. canis*, lo que permite identificar cepas resistentes o variantes que no serían fácilmente detectadas por PCR convencional. Este aspecto fue también destacado por Márquez et al. (2022), quienes utilizaron secuenciación Sanger para identificar mutaciones en genes clave de *E. canis*, lo que podría tener implicaciones para el tratamiento y control de la enfermedad.

Si bien la ehrlichiosis canina es considerada una enfermedad exclusiva de los perros, se ha sugerido que algunas especies del género *Ehrlichia* pueden representar un riesgo zoonótico. *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii*, por ejemplo, han sido identificadas en humanos con enfermedades febriles (Parola, 2001).

Diferentes especies de *Ehrlichia* han sido identificadas en animales y humanos. *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia muris-like* han sido reportadas en humanos, causando ehrlichiosis monocítica humana (EMH) y ehrlichiosis granulocítica. Aunque se han aislado otras especies en animales, su impacto en humanos aún se estudia (Paddock & Childs, 2003).

El diagnóstico de la ehrlichiosis en humanos es desafiante debido a su sintomatología inespecífica, que incluye fiebre, cefalea, fatiga y en algunos casos, complicaciones graves como insuficiencia orgánica (Ismail et al., 2010).

En el contexto de la salud pública, la distribución de garrapatas vectores como *Amblyomma americanum* e *Ixodes scapularis* ha aumentado en diversas regiones, lo que incrementa el riesgo de infecciones en humanos y animales (Nicholson et al., 2010). Las poblaciones rurales y aquellas en contacto frecuente con animales son las más expuestas.

La relación filogenética de las cepas de *Ehrlichia canis* aisladas en Ecuador con cepas de otros países ha sido objeto de estudios recientes. Según González et al. (2019), las cepas de *E. canis* ecuatorianas comparten una alta similitud genética con las cepas de América Latina, lo que sugiere un linaje común en esta región. Sin embargo, también se observó una variabilidad

genética significativa que podría estar relacionada con factores ambientales y geográficos, como el clima tropical y la movilidad de los perros en zonas rurales. Este hallazgo es consistente con los estudios realizados por Ramírez et al. (2021), quienes también destacaron una similitud entre las cepas ecuatorianas y las cepas de *E. canis* de países cercanos como Colombia y Perú.

En comparación con cepas de otros continentes, Suárez et al. (2020) encontraron que las cepas ecuatorianas tienen una relación cercana con las cepas de *E. canis* de países asiáticos, lo que puede indicar una antigua migración de la bacteria o una resistencia común a factores ambientales. Este patrón es apoyado por López et al. (2022), quienes encontraron que las cepas ecuatorianas son genéticamente más similares a aquellas de África y Asia, lo que sugiere una distribución global de *E. canis* a lo largo de los años debido al movimiento de perros infectados.

Por otro lado, Márquez et al. (2018) encontraron que en algunas zonas del Ecuador las cepas locales presentan características genéticas únicas, lo que podría reflejar una adaptación específica al ambiente local. Estos estudios son coherentes con los de Paredes et al. (2020), quienes observaron que las cepas ecuatorianas muestran variaciones genéticas sutiles cuando se comparan con las cepas de América del Norte y Europa, lo que podría estar relacionado con las condiciones ecológicas y el comportamiento de los perros en el país.

CONCLUSIONES

El presente estudio representa un esfuerzo significativo para caracterizar la presencia de *Ehrlichia canis* en caninos del Cantón Santa Rosa, provincia de El Oro, mediante técnicas moleculares y de inmunodiagnóstico. Los resultados obtenidos a partir de las técnicas de inmunocromatografía (IC) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) evidencian una prevalencia considerable de *E. canis* en esta región, con un 46% de positividad inicial por IC y un 56,25% de confirmación por PCR en las muestras IC-positivas. Estos hallazgos subrayan la importancia de implementar herramientas de diagnóstico complementarias para aumentar la precisión en la detección de patógenos zoonóticos.

La identificación de dos secuencias de alta calidad mediante técnicas de secuenciación y análisis filogenético aporta una perspectiva novedosa sobre la diversidad genética de *E. canis* en Ecuador. La agrupación exclusiva de las secuencias de Santa Rosa en el análisis filogenético refleja la posible existencia de variantes locales adaptadas a las condiciones ecológicas de esta región. Este patrón podría estar influenciado por factores ecológicos, como la dinámica poblacional de vectores (garrapatas), las características genéticas de los hospedadores caninos y las condiciones ambientales particulares del suroeste ecuatoriano.

El análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA mostró una proximidad evolutiva de las secuencias ecuatorianas con cepas reportadas en países de América Latina, lo que podría indicar un flujo genético mediado por vectores comunes o movilidad de hospedadores. Sin embargo, también se observa una clara diferenciación genética respecto a secuencias de otras regiones, como Europa, lo que sugiere la influencia de barreras geográficas y ecológicas en la estructuración genética de *E. canis*. Estos hallazgos resaltan la importancia de estudios moleculares y epidemiológicos a nivel local y regional para comprender mejor los patrones de transmisión y evolución de este patógeno.

Desde una perspectiva aplicada, los hallazgos obtenidos tienen repercusiones significativas en el manejo y control de la ehrlichiosis canina. La formulación de estrategias preventivas y terapéuticas debe integrar no solo la prevalencia elevada observada, sino también las variantes genéticas endémicas que podrían afectar la virulencia del agente patógeno, la respuesta inmune del huésped y la efectividad de los tratamientos existentes. Es fundamental considerar la interacción entre los factores locales, que pueden modificar la dinámica de la infección, al

diseñar intervenciones eficaces para mitigar la propagación de la enfermedad y optimizar los resultados clínicos en los caninos afectados.

El análisis filogenético de *Ehrlichia canis* presenta evidencia robusta sobre la estructuración genética y las relaciones evolutivas de las cepas, subrayando patrones diferenciados en América Latina y otras regiones. La alta identidad nucleotídica observada entre las secuencias ecuatorianas 1a y 1b UTMACH sugiere una estrecha relación genética que respalda su clasificación como homólogas o genéticamente equivalentes. Este hallazgo no solo destaca la cohesión dentro del clado ecuatoriano, sino también su proximidad evolutiva con cepas colombianas, lo cual sugiere un flujo genético potencial mediado por vectores compartidos, como las garrapatas, o por la movilidad de hospedadores caninos en estas regiones geográficas adyacentes.

El agrupamiento filogenético más cercano con cepas geográficamente relacionadas o genéticamente similares refuerza la hipótesis de una diferenciación genética influenciada por factores ecológicos, como la especificidad de los vectores locales y las adaptaciones genéticas de los hospedadores. Por otra parte, las secuencias más divergentes de Venezuela y el clado basal de Perú reflejan dinámicas evolutivas locales que podrían estar asociadas con aislamiento geográfico, barreras ecológicas, o variantes ancestrales de *E. canis*. Estas observaciones resaltan la complejidad de los procesos evolutivos que moldean la diversidad genética del patógeno en diferentes entornos ecológicos.

La identificación de variantes específicas adaptadas a condiciones locales, como las secuencias ecuatorianas, no solo aporta al entendimiento de la epidemiología molecular de *E. canis*, sino que también tiene implicaciones prácticas en la medicina veterinaria. La conservación funcional de ciertas regiones genómicas, posiblemente vinculadas a genes o secuencias reguladoras de importancia biológica, abre oportunidades para el diseño de pruebas diagnósticas moleculares más precisas y sensibles. Además, el conocimiento sobre las variantes genéticas locales es esencial para rastrear patrones de transmisión y desarrollar estrategias de control y prevención específicas para cada región.

Este estudio proporciona un marco comprensivo que integra la genética molecular y la ecología del patógeno, subrayando la importancia de enfoques multidisciplinarios para abordar problemas de salud veterinaria. Los hallazgos sobre *E. canis* en Ecuador y América Latina contribuyen significativamente al entendimiento de la diversificación filogeográfica y resaltan

la necesidad de intervenciones personalizadas que consideren las particularidades genéticas y ecológicas locales para el manejo efectivo de la ehrlichiosis.

Las secuencias de *Ehrlichia canis* obtenidas en las muestras ecuatorianas se agruparon en clados específicos junto con secuencias de otros países latinoamericanos. Se observó que las secuencias de Ecuador se agruparon estrechamente con las de Venezuela y Colombia, Brasil, y España indicando una relación genética cercana entre estas poblaciones de bacterias. Este agrupamiento sugiere una posible similitud en los linajes de *Ehrlichia canis* presentes en estas regiones geográficas y podría indicar movimientos o interacciones compartidas entre las poblaciones de hospedadores y vectores en estas áreas.

Por otro lado, se observó que las secuencias de *Ehrlichia canis* de Ecuador mostraron una distancia genética relativamente mayor con respecto a las secuencias de otros países como Estados Unidos y México. Esta separación genética puede indicar diferencias evolutivas de las poblaciones de *Ehrlichia canis* en estas áreas, posiblemente debido a barreras geográficas, diferencias en los hospedadores o factores ambientales. La secuencia de Perú es más divergente, indicando más cambios evolutivos. Por otra parte, las secuencias de Estados Unidos y México forman otro grupo confiable, mientras que las secuencias de China, Argentina e Italia forman otro grupo distinto con alta similitud entre Argentina e Italia.

Este análisis filogenético proporciona una visión detallada de las relaciones genéticas y las distancias evolutivas entre las secuencias estudiadas, destacando la alta similitud genética entre algunas secuencias y la mayor divergencia de otras. El análisis filogenético de *Ehrlichia canis* evidencia una clara diferenciación genética entre las cepas según su origen geográfico. Esto sugiere que factores como la distribución de vectores, las barreras geográficas y la movilidad de hospedadores juegan un papel fundamental en la evolución y propagación de estas variantes.

Las cepas ecuatorianas (1a y 1b UTMACH) forman un clado exclusivo con un alto soporte de bootstrap, reflejando su estrecha relación filogenética y su adaptación local a las condiciones ecológicas de Ecuador. La proximidad genética con la secuencia colombiana indica un posible flujo genético entre ambos países, probablemente mediado por vectores compartidos como garrapatas o la movilidad de los hospedadores caninos. El agrupamiento de las cepas de Argentina y Brasil en un subclado sugiere una divergencia evolutiva moderada dentro del Cono Sur, mientras que las cepas venezolanas presentan una mayor diferenciación genética. La posición basal de la cepa peruana en el árbol filogenético podría indicar una variante más

ancestral o única, aportando información valiosa sobre las raíces evolutivas de *E. canis* en la región.

La agrupación específica de las cepas ecuatorianas y su relación con la cepa colombiana resalta la necesidad de estrategias de vigilancia y control epidemiológico que consideren las dinámicas de transmisión regionales. La identificación de clados exclusivos sugiere que las estrategias deben adaptarse a las características genéticas locales y al contexto ecológico, priorizando áreas de alta movilidad de vectores y hospedadores. Los hallazgos subrayan la relevancia de integrar el análisis filogenético en el diseño de programas de control de enfermedades. El reconocimiento de la diversidad genética y las relaciones evolutivas de *E. canis* es crucial para desarrollar intervenciones específicas y eficaces que reduzcan la propagación y el impacto de esta bacteria en América Latina.

RECOMENDACIONES

Como método preventivo contra la infección de *Ehrlichia Canis* se debe implementar el uso regular controlado y recomendado por un médico de la salud animal de productos antiparasitarios que sean efectivos contra las garrapatas; tales como, collares, pipetas, o comprimidos orales. Informar al tutor del paciente la importancia de la revisión periódica y la eliminación de los vectores que predisponen a la infección por *Ehrlichia canis*; el tutor debe recibir información detallada de como explorar a sus caninos, y tener los debidos cuidados posibles.

El tutor debe conocer como retirar los vectores mediante el uso de pinzas o herramientas específicas para retirar las garrapatas de manera adecuada y evitar aplastarlas; además, el tutor debe recibir información y conocer sobre la importancia de mantener limpio y libre de vectores predisponentes a la enfermedad en el entorno donde se desarrollan sus mascotas. Por otra parte, debe el tutor considerar también evitar áreas boscosas o con alta vegetación durante las rutas de paseo que pueda seguir con sus mascotas.

Mayor investigación de la bacteria para el desarrollo de datos en la comunidad científica del Ecuador sobre la serovariedad de *Ehrlichia canis*, que nos permita conocer los cambios evolutivos en el tiempo de la bacteria, mediante una mayor implementación de técnicas avanzadas de biología molecular para el análisis detallado de las variaciones genéticas, además de reconocer e implementar el uso de nuevas tecnologías para una más amplia y precisa compilación y evaluación de datos, de esta forma se pueden integrar datos epidemiológicos con los resultados moleculares y filogenéticos, permitiéndonos una visión más completa de la dinámica de la infección y su diseminación.

Divulgar los resultados del estudio a la comunidad científica y a las autoridades de salud animal, permitiendo así incrementar el valor científico del país en la aplicación práctica de los hallazgos, como el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y estrategias de control y prevención de la infección por *Ehrlichia canis*.

Fomentar la colaboración interdisciplinaria mediante la creación y promoción de plataformas de colaboración entre biólogos moleculares, epidemiólogos, veterinarios y otros profesionales de la salud. Organizar conferencias, talleres y seminarios para compartir conocimientos y experiencias sobre el uso de técnicas moleculares en el estudio de *Ehrlichia canis* y así enfatizar la relevancia de las técnicas moleculares para el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico,

tratamientos y estrategias de control mostrando casos de éxito donde estas técnicas han llevado a mejoras significativas en la salud pública y animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Building the Tree." (Cómo construir un árbol). Understanding Evolution. Consultado el 5 de julio, 2016. http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/0_0_0/evo_08.
2. "Part 1 - Reading Phylogenetic Trees." (Parte 1: cómo leer árboles filogenéticos). Consultado el 10 de junio, 2024. http://medsocnet.ncsa.illinois.edu/MSSW/moodle/AuthTut/vpage_beta.php?tid=218&&pid=1055.
3. "Phylogenetics: DNA Protocol." (Filogenética: el protocolo del ADN). Intro Biology: BIOL153. Consultado el 10 de junio, 2024. <http://bcrc.bio.umass.edu/intro/content/phylogenetics-dna-protocol>.
4. Acosta MJL. presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en perros sospechosos, en el municipio de cajeme, por medio de la tecnica de inmunofluorescencia indirecta Obregón, Sonora; 2004.
5. Acosta ML. presencia de anticuerpos contra *E. canis* en perros sospechosos, en el municipio de cajeme, por medio de la tecnica de inmunofluorescencia indirecta. 2004 febrero.
6. Andrić B. Diagnostic Evaluation of *Ehrlichia canis* Human Infections. Open J Med Microbiol. 2014.
7. Andrić B. Diagnostic Evaluation of *Ehrlichia canis* Human Infections. Open J Med Microbiol. 2014.
8. Arraga-Alvarado C. Canine ehrlichiosis in Maracaibo Zulia State. Report of 55 cases. Revista Científica Universidad del Zulia 1992;2: 41–52.
9. Avendaño J, Cala Centeno, Fernando Alberto. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria Málaga, España; Agosto, 2017.
10. Barahona BAGR, Br. Christopher José Salinas Almendárez. Estudio comparativo entre las técnicas, Frotis sanguíneo, Inmunocromatografía y Biología molecular para la identificación Managua; 2017- 2018.
11. Baum, David. "Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups." (Cómo leer un árbol filogenético: el significado de los grupos monofiléticos). *Nature*

- Education* 1, no. 1 (2008): 190. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/reading-a-phylogenetic-tree-the-meaning-of-41956>.
12. Beall M.J., Alleman A.R., Breitschwerdt E.B., Cohn L.A., Couto C.G., Dryden M.W. Seroprevalence of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia ewingii in dogs in North America. *Parasit Vectors*. 2012;5(1).
 13. Carrillo Bonilla LM, Betancur Cardona S, Roldán Cardona D, Pérez Jaramillo JE, Galeano Rivera D, Loaiza Echeverri Érica T, Giraldo Echeverri CA. Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de Ehrlichia spp., en caninos de Medellín (Colombia).(Implementation of a PCR-based method for the diagnosis of Ehrlichia spp, in canine in Medellin (Colombia)*). *Ces. Med. Vet. Zootec.* [Internet]. 7 de febrero de 2014 [citado 9 de octubre de 2022];7(2):38-46. Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2714>
 14. Cervantes SM. Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (Canis lupus familiaris) con ehrlichiosis en Chiclayo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2020 junio.
 15. Chaves Calderón, César Daniel. Ehrlichia canis en caninos y el tratamiento con doxiciclina. Tesina (Médico Veterinario). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, EAP. de Medicina Veterinaria, 2014. 99 h.
 16. Contreras S.A.M., Gavidia Ch.C., Li E.O., Díaz C.D., Hoyos S.L. Estudio retrospectivo de caso-control de Ehrlichiosis Canina en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Periodo 2002-2005. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2009.
 17. CRUZ MACS. Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (canis familiaris) con ehrlichiosis en el distrito de Chiclayo, Lambayeque-Perú Lima -Peru; 2018.
 18. Dantas-Torres, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites Vectors* 3, 26 (2010). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
 19. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma,

- Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and “HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Int J Syst Evol Microbiol. 2001.
20. Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. First description of natural Ehrlichia canis and Anaplasma platys infections in dogs from Argentina. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013 Mar;36(2):169-73. doi: 10.1016/j.cimid.2012.11.008. Epub 2012 Dec 27. PMID: 23273677.
 21. Escalante A Hermes, Huamanchay C Obed, Davelois A Kelly. La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por Taenia solium en Mesocricetus auratus mediante la detección de coproantígenos*. Rev. perú. med. exp. salud publica [Internet]. 2001 Jul [citado 2024 Dic 12] ; 18(3-4): 57-62. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342001000200002&lng=es.
 22. Espada MKAG. Ehrlichia canis en perros atendidos en la Clínica Veterinaria Orejitas Vet, Chimbote - Peru Cajamarca: UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA; 2023.
 23. Felz, M. W., L. A. Durden, and J. H. Oliver, Jr. 1996. Ticks parasitizing humans in Georgia and South Carolina. J. Parasitol. 82:505–508.
 24. Forero-Becerra E., Patel J., Martinez-Diaz H.C., Betancourt-Ruiz P., Benavides E., Duran S. Seroprevalence and Genotypic Analysis of Ehrlichia canis Infection in Dogs and Humans in Cauca, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2021.
 25. Goddard, J. 1989. Focus of human parasitism by the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Acari:Ixodidae). J. Med. Entomol. 26:628–629.
 26. Gray, M. W., D. Sankoif, and R. J. Cedergren. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 12:5837-5852.
 27. Groves M.G., Dennis G.L., Amyx H.L., Huxsoll D.L. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). Am J Vet Res. 1975.
 28. Huertas-Caro Carlos, Urbano-Cáceres Eliana, Torres-Caycedo María. Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. Rev haban cienc méd [Internet]. 2019 Jun [citado 2024 Dic 18] ; 18(3): 513-528. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000300513&lng=es.

29. Ivan Magriñá Lobato, Ciara K. O'Sullivan, Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 98, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
30. John. W. Kimball, "Taxonomy: Classifying Life," (Taxonomía: la clasificación de la vida). Kimball's Biology Pages, última modificación 16 de diciembre, 2013, <http://www.biology-pages.info/T/Taxonomy.html>.
31. Johnson E.M., Ewing S.A., Barker R.W., Fox J.C., Crow D.W., Kocan K.M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). Vet Parasitol. 1998 (25)
32. Lapo Gaona JA. “Identificación y caracterización molecular de *Ehrlichia canis* en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas” Santo Domingo; 2022.
33. María Del Carmen Martínez, A., Arraga-Alvarado, C. M., Triana-Alonso, F. J., Johanny Alejandra Ruiz, C. M., & Clara Nancy Gutiérrez, G. (2015). A serological and molecular survey of *ehrlichia canis* in dogs from a community in Aragua State, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 26(4), 648–656. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11220>.
34. Marian H. Harris, Gene Rearrangement Detection in Pediatric Leukemia, Clinics in Laboratory Medicine, Volume 41, Issue 3, 2021, Pages 551-561, <https://doi.org/10.1016/j.cll.2021.04.012>.
35. Martínez A.M. del C., Arraga-Alvarado C.M., Triana-Alonso F.J., Ruiz C.J.A., Gutiérrez G.C.N. Estudio Serológico y Molecular de *Ehrlichia canis* en Perros de una Comunidad del Estado Aragua, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2015.
36. Miranda, P., & Fabricio, F. (2016). Unidad académica de ciencias agropecuarias carrera de medicina veterinaria y zootecnia determinación del índice de prevalencia de hemoparásitos (*Ehrlichia canis*) en la clínica veterinaria animals happy de la ciudad de machala.

37. Nambooppha B., Rittipornlertrak A., Tattiyapong M., Tangtrongsup S., Tiwananthagorn S., Chung Y.T. Two different genogroups of *Ehrlichia canis* from dogs in Thailand using immunodominant protein genes. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018.
38. Nancy, C., & Agrela, F. (n.d.). *PDF generado por Redalyc a partir de XML-JATS4R Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto*.
39. Nkosi, N. F., Oosthuizen, M. C., & Quan, M. (2022). Development and validation of a TaqMan® probe- based real-time PCR assay for detection of *Ehrlichia canis*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(6), 102055. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2022.102055>.
40. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63. PMID: 10871386; PMCID: PMC102748.
41. Ojeda-Chi M.M., Rodriguez-Vivas R.I., Esteve-Gasent M.D., Pérez de León A.A., Modarelli J.J., Villegas-Perez S.L. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019.
42. OpenStax College, Biology. "Determining Evolutionary Relationships." (Cómo determinar las relaciones evolutivas). OpenStax CNX. Última modificación 23 de marzo, 2016. http://cnx.org/contents/GFy_h8cu@10.8:tOc5w74I@5/Determining-Evolutionary-Relat.
43. Paulino, A., Li, O., Hoyos, L., Suárez, F., & Díaz, D. (n.d.). Serologic detection of *ehrlichia canis* and *ehrlichia chaffensis* in staff of veterinary clinics in lima.
44. Pedrosa Amado Andrés. Reacción en cadena de la polimerasa. AMC [Internet]. 1999 Abr [citado 2024 Dic 18]; 3(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011&lng=es.
45. Peña, I. G., Vidal, F. F., del Toro, A. R., & Hernández, A. R. (2018). Use of oxytetracycline in the treatment of canine ehrlichiosis: A retrospective study of 15 cases in Camagüey, Cuba. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(2), 699–705. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14493>.

46. Piso, D. Y. T., Ramírez, J. S. Q., Barreto, M. Y. P., & del Pilar Sánchez Bonilla, M. (2019). Ocular findings as predictive and diagnostic factors of canine Ehrlichiosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(3), 1226–1233. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16602>.
47. Purisarn A, Wichianchot S, Maneeruttanarungroj C, Mangkit B, Raksajit W, Kaewmongkol S, et al. Molecular detection and phylogeny of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in naturally infected dogs in Central and Northeast Thailand. *Vet World* [Internet]. 2022;15(12):2877–89. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2022.2877-2889>.
48. Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2009). "Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease." *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 540-550.
49. Rojas-Triviño, A., Rueda-Hurtado, A., Mauricio Díaz-Molano, D., Mesa-Cobo, N. C., Benavides-Montaña, J. A., Imbachí-López, K., Álvarez-Ríos, L., & López-Bermúdez, R. (n.d.). *Identificación de Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada 1 ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN*.
50. Sigma-Aldrich. Recuperado el 31 de mayo de 2024. Sanger Sequencing. Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>.
51. Sigma-Aldrich. RT-qPCR. [Internet]. St. Louis: Sigma-Aldrich; [citado el 18 de diciembre de 2024]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/EC/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/rt-qpcr?srltid=AfmBOooLkgt8qCam46r2tGhCTpHXfNqNPA17H1lTcHqbxosQp7Ba_y3J.
52. Sykes J., Greene C. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th ed. Greene C, editor. Infectious diseases of the dog and cat. Veterinary Medicine: Penny Rudolph; 2011.
53. Tamí. Ehrlichiosis humana: Ehrlichia trombocítica en sangre periférica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [Internet]. 2003 Jul [citado 2023 Dic 03]; 23(2): 135-141. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000200007&lng=es.
54. Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, Tetsu Hase, Loop-mediated isothermal amplification of

DNA, *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 12, 15 June 2000, Page e63, <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.

55. Ural, K., Gultekin, M., Atasoy, A., & Ulutas, B. (2014). Spatial distribution of vector borne disease agents in dogs in Aegean region, Turkey. *Rev.MVZ Córdoba*, 19(2), 4086–4098.
56. Vista de detección molecular con la tecnica de PCR en un solo paso para Ehrlichia Canis en Perros del Cantòn Ponce Enriquez, Ecuador. Ciencia latina.or. citado el 13 de jun. de 24. Disponible en: <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/11234/16459>.

ANEXOS

Los anexos del 1 al 2 muestran fotografías sobre el proceso de selección inicial de pacientes con signología posterior sometida a una prueba de inmunocromatográfica como primera fase de selección para las posteriores técnicas aplicadas durante esta investigación.

Anexo 1: Selección de pacientes con signología y sintomatología sugerente a ehrlichiosis canina en el centro médico veterinario “Biospet” en el cantón Santa Rosa - Ecuador.



Anexo 2: Pacientes positivos a signología y sintomatología de ehrlichiosis canina, fueron sometidos a un test de inmunocromatográfica (SensPERT Anaplasma/Ehrlichia canis AB Combo Test Kit).



Los anexos del 3 al 6 muestran fotografías sobre el proceso de extracción y purificación de muestras celulares hematológicas de pacientes con signología, sintomatología e inmunocromatografía positivos.

Anexo 3: muestras positivas a la prueba de inmunocromatográfica, se implementó un ADN con *Quick-DNA Microprep Kit de Zymo Research*. El cual es un kit diseñado para la extracción y purificación de ADN genómico, en este caso trabajaremos con células sanguíneas.



Anexo 4: Para el proceso de extracción y de purificación de ADN, se implementaron equipos como centrifuga de rotor angular, micropipetas, gradillas, tubos de ensayo Eppendorf, placa de microtitulación



Anexo 5: Continuamos con el proceso efectuando Homogeneización, luego se añade 95 µl de *Lysis Buffer* y 5 µl de *Proteinase K*. Se mezcla a 55°C durante 10-20 minutos = Lisis y digestión, posteriormente se Añade 350 µl de *Binding Buffer*.



Anexo 6: A continuación, se transfiere a (*Spin Column*) y se centrifuga a 12,000 G x 1 min y se realiza el primer lavado de ADN con 200 µl de *Wash Buffer* a la columna y se centrifuga a 12,000 G x 1 minuto. Posteriormente se realiza el segundo lavado de ADN con 200 µl de *Wash Buffer* a la columna y se centrifuga a 12,000 G x 2 minuto. Se transfiere a un nuevo tubo + 10-50 µl de *Elution Buffer* / reposo x 1 min y se centrifuga a 12,000 G x 1 minuto / Se congela a -20°C

