



**“Identificación y caracterización molecular de *Ehrlichia canis* en caninos del albergue
“Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas”**

Lapo Gaona, Jessica Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Reyna Bello, Armando Ph.D.

02 de marzo del 2022

Reporte de Verificación de contenido



COPYLEAKS

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR_Lapo.Copyleaksdo...

Scanned on: 20:13 March 2, 2022 UTC



| | |
|--------------------------|-----|
| Identical Words | 171 |
| Words with Minor Changes | 0 |
| Paraphrased Words | 0 |
| Omitted Words | 0 |

 Website | Education | Businesses

Firma:



Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
ou=SECURITY DATA S.A.-I, ou=ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE INFORMACION,
serialNumber=290620182334, cn=ARMANDO
REYNA BELLO
Fecha: 2022.03.02 19:38:41 -05'00'

Reyna Bello, Armando PhD

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Identificación y caracterización molecular de Ehrlichia canis en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas”** fue realizado por la señorita **Lapo Gaona, Jessica Alexandra** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo del 2022

Firma:


Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1, ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION, serialNumber=290620182334, cn=ARMANDO REYNA BELLO
Fecha: 2022.03.02 19:39:04 -05'00'

Reyna Bello, Armando PhD

C.C. 1758891830



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Lapo Gaona Jessica Alexandra**, con cédula de ciudadanía n° 1104332612, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Identificación y caracterización molecular de *Ehrlichia canis* en caninos del albergue "Narices Frías" de Santo Domingo de los Tsáchilas**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo del 2022

Firma

Lapo Gaona, Jessica Alexandra

C.C.: 1104332612



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Lapo Gaona Jessica Alexandra**, con cédula de ciudadanía n° 1104332612, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Identificación y caracterización molecular de *Ehrlichia canis* en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo del 2022

Firma



Lapo Gaona, Jessica Alexandra

C.C.: 1104332612

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres por haberme brindado siempre su apoyo incondicional para continuar mi preparación académica e impulsarme a alcanzar mis metas, especialmente a mi madre, por confiar en mí, acompañarme y guiarme en todo momento, aunque ya no se encuentre conmigo, siempre permanecerá en mi corazón y seguirá siendo uno de los pilares fundamentales de mi vida.

A mis hermanos Karla e Iker por motivarme a ser una mejor persona, por haber compartido momentos de grandes alegrías y celebrar conmigo cada logro alcanzado.

A mi perrito Rocky por acompañarme a lo largo de 9 años y seguir brindándome su cariño y compañía.

A mis abuelitos, mi tía Libia y mi familia en general, que de igual manera me han brindado su cariño y apoyo para seguir superándome día a día.

Jessica.

Agradecimiento

Primeramente, agradezco a Dios quien me guía y nunca me abandona, por haberme permitido culminar una etapa más de mi preparación académica. Y a mis padres por el cariño que me han dado, por apoyar mis decisiones y motivarme a enfrentar los problemas que se puedan presentar.

A mis hermanos y demás familiares por su cariño incondicional, especialmente a mi tía Libia que a pesar de la distancia se preocupa por mí y me motiva a seguir superándome.

A mis amigos del colegio, María, Cris, Luber y Nataly, que me apoyaron a lo largo de toda la carrera y me acompañaron durante momentos difíciles.

A mis amigos de la universidad, especialmente a Briggith, Génesis, Ángela y Joss por confiar en mí, por ayudarme durante toda la carrera, por la paciencia que han tenido conmigo y por los buenos momentos vividos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Kelly, Kevin, Hugo y Jordan por haberme ayudado en varias fases del proyecto de titulación.

Al personal del albergue Charli de Santo Domingo y a la Sra. Dolores en Chone por habernos permitido realizar la toma de muestras en los respectivos albergues. Y a la Dra. Karolina por proporcionarnos las muestras procedentes del cantón Sucre.

A la Dra. Fernanda, Dra. Karolina, Dra. Brenda y Génesis Rosero, por su ayuda durante la toma de muestras.

Agradezco al Dr. Armando Reyna, director de tesis, por su paciencia, ayuda y guías brindadas, por habernos acompañado durante toda la carrera y por darme la oportunidad de ampliar mis conocimientos prácticos de biología molecular, primero mediante prácticas pre-profesionales y ahora a través de la realización del proyecto de titulación.

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| Carátula..... | 1 |
| Reporte de Verificación de contenido | 2 |
| Certificación..... | 3 |
| Responsabilidad de autoría | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria | 6 |
| Agradecimiento | 7 |
| Índice de contenidos..... | 8 |
| Índice de tablas | 10 |
| Índice de figuras | 10 |
| Abreviaturas | 11 |
| Resumen..... | 12 |
| Abstract | 13 |
| Capítulo I..... | 14 |
| Introducción..... | 14 |
| Formulación del problema..... | 14 |
| Justificación del problema..... | 15 |
| Objetivos..... | 17 |
| Objetivo general | 17 |
| Objetivos específicos..... | 17 |
| Capítulo II..... | 18 |
| Revisión de literatura..... | 18 |
| Historia | 18 |
| Taxonomía..... | 19 |
| Morfología..... | 19 |
| Distribución | 20 |
| Transmisión | 20 |
| Patogénesis..... | 21 |
| Signos clínicos..... | 22 |
| Métodos de diagnóstico | 23 |
| Diagnóstico mediante frotis sanguíneo | 24 |
| Diagnóstico serológico | 24 |
| Diagnóstico molecular | 25 |

| | |
|---|----|
| Identificación de <i>E. canis</i> mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) | 25 |
| Tratamiento..... | 26 |
| Capítulo III..... | 27 |
| Materiales y métodos | 27 |
| Toma de muestras de sangre | 27 |
| Tinción de frotis sanguíneo | 28 |
| Extracción de ADN..... | 28 |
| Determinación de la calidad del ADN..... | 30 |
| Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para <i>Ehrlichia spp.</i> | 30 |
| Identificación de <i>E. canis</i> mediante digestión con enzimas de restricción (RFLP)..... | 32 |
| Diagnóstico de la prevalencia de <i>E. canis</i> | 34 |
| Capítulo IV | 35 |
| Resultados | 35 |
| Frotis sanguíneo | 35 |
| Extracción de ADN..... | 35 |
| Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR | 36 |
| Identificación de <i>E. canis</i> mediante PCR-RFLP | 39 |
| Prevalencia de <i>E. canis</i> en los cantones muestreados | 40 |
| Capítulo V | 42 |
| Discusión..... | 42 |
| Capítulo VI | 45 |
| Conclusiones y recomendaciones | 45 |
| Conclusiones | 45 |
| Recomendaciones | 47 |
| Capítulo VII | 48 |
| Bibliografía | 48 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Reactivos utilizados para la preparación de los buffers | 29 |
| Tabla 2 Reactivos y condiciones de la PCR para amplificación de 16S rRNA en Ehrlichia spp | 31 |
| Tabla 3 Reactivos utilizados en la digestión con enzima HindIII para identificación de E. canis..... | 33 |
| Tabla 4 Prevalencia de E. canis en tres cantones del Ecuador | 41 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 Clasificación taxonómica según Dumler et al. (2001) | 19 |
| Figura 2 Ciclo de vida de E. canis en la garrapata R. sanguineus (Sykes, 2016) | 21 |
| Figura 3 Epistaxis en perro infectado con E. canis (Day, 2020)..... | 23 |
| Figura 4 Toma de muestra sanguínea en el albergue Narices Frías..... | 28 |
| Figura 5 Corte del fragmento de E. canis obtenido con la enzima de restricción HindIII | 32 |
| Figura 6 Monocito en frotis sanguíneo..... | 35 |
| Figura 7 ADN genómico obtenido de canes del albergue Narices Frías | 36 |
| Figura 8 Producto de PCR correspondiente a las muestras del albergue Narices Frías | 37 |
| Figura 9 Producto de PCR correspondiente a las muestras 55 a 61 obtenidas en Chone..... | 38 |
| Figura 10 Producto de PCR correspondiente a las muestras 62 a 68 obtenidas en Chone..... | 38 |
| Figura 11 Producto de PCR correspondiente a las muestras 72 a 76 obtenidas en Chone..... | 39 |
| Figura 12 Producto obtenido a partir de la digestión con la enzima HindIII | 40 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| °C | Grados centígrados |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| 16S rRNA | Ácido ribonucleico ribosomal 16S |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| CME | Erlichiosis Monocítica Canina |
| dNTP | Desoxirribonucleótidos trifosfatados |
| EDTA | Ácido etilenodiaminatetraacético |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanogramos |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimersa |
| p/v | Peso – Volumen |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RFLP | Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| U | Unidades |
| v/v | Volumen – Volumen |

Resumen

La Erlichiosis Monocítica Canina (CME) es una de las enfermedades caninas más importantes debido a su prevalencia, esta es causada por la bacteria *Ehrlichia canis* y transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Los signos clínicos de la enfermedad pueden variar dependiendo de la fase clínica en la que se encuentre el can, sin embargo, entre los síntomas más comunes se encuentra la pérdida de peso, fiebre, debilidad y depresión. Considerando que existe una gran cantidad de canes abandonados que son propensos a contagiarse de garrapatas e infectarse con la bacteria, se planteó realizar un estudio a fin de determinar mediante PCR la presencia de *E. canis* en un refugio de Santo Domingo. Adicionalmente, se realizó otro muestreo en la ciudad de Chone y se obtuvieron muestras procedentes de una clínica veterinaria del cantón Sucre. Se obtuvo un total de 102 muestras de sangre, de las cuales 54 provenían del refugio Narices Frías de Santo Domingo, 22 de Chone y 26 de Sucre se realizaron frotis y extracción de ADN. Una vez obtenido el ADN, se procedió a realizar la PCR, donde el gen diana fue 16S rRNA de la familia de las Rickettsias. Los resultados obtenidos reflejaron que, los canes del refugio Narices Frías y de la ciudad de Sucre se encontraban libres de infecciones de *E. canis*. Sin embargo, en el cantón Chone se detectaron 3 casos positivos y se determinó una prevalencia del 13,64%. Estos resultados indican la importancia de esta enfermedad en Ecuador y por tanto se deben seguir realizando estudios para comprender más su epidemiología, clínica y control.

Palabras clave:

- ***EHRlichia CANIS***
- ***RHIPICEPHALUS SANGUINEUS***
- **GARRAPATA**
- **CANINOS**

Abstract

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is one of the most important canine diseases due to its prevalence, it is caused by the bacteria *Ehrlichia canis* and transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. The clinical signs of the disease may vary depending on the clinical phase in which the dog is, however, the most common symptoms include weight loss, fever, weakness and depression. Considering that there is a large number of abandoned dogs that are prone to being infected with ticks and bacteria, this study was proposed with the objective to determine the presence of *E. canis* by PCR in one shelter in Santo Domingo. Additionally, another sampling was carried out in the city of Chone and samples were obtained from a veterinary clinic in the Sucre canton. A total of 102 blood samples were obtained, of which 54 came from the Narices Frías refuge in Santo Domingo, 22 from Chone and 26 from Sucre, smears and DNA extraction were performed for this samples. Once the DNA was obtained, the PCR was carried out, where the target gene was 16S rRNA of the Rickettsia family. The results obtained showed that the dogs from the Narices Frías shelter and from the city of Sucre were free of *E. canis* infections. However, in Chone, were detected 3 positive cases and was determined a prevalence of 13.64%. These results indicate the importance of this disease in Ecuador and therefore further studies should be carried out to better understand its epidemiology, clinic and control.

Key words:

- ***EHRlichia CANIS***
- ***RHIPICEPHALUS SANGUINEUS***
- **TICK**
- **CANINES**

Capítulo I

Introducción

Formulación del problema

Ehrlichia canis es una bacteria Gramnegativa intracelular obligada causante de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME). Es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la cual se encuentra distribuida ampliamente a nivel mundial e infecta a las especies de la familia Canidae, siendo su principal hospedador el perro doméstico *Canis lupus familiaris* (Day, 2020).

La bacteria *E. canis* fue identificada por primera vez en Argelia en el año 1935 por Donatien y Lestoquard y posteriormente esta se distribuyó a nivel mundial (Harrus & Waner, 2011).

La ehrlichiosis canina puede ocasionar diversas afecciones en el animal y su gravedad varía dependiendo de la fase clínica en la que se encuentre la enfermedad y la condición del animal. Entre la sintomatología característica se encuentra el decaimiento, pérdida de peso, fiebre, palidez en las mucosas y trombocitopenia (Rodríguez-Vivas, Bolio-González, & Ojeda-Chi, 2015). A pesar de que *E. canis* no se considera un agente zoonótico, existe evidencia que señala que en el año de 1996 se reportó en Venezuela un agente similar a *E. canis* aislado a partir de un ser humano, dicho agente fue catalogado como una nueva subespecie o cepa de *E. canis* (Perez, Rikihisa, & Wen, 1996). Cabe mencionar que la ehrlichiosis humana es causada por *E. chaffeensis* y algunos de los síntomas causados por esta enfermedad son náuseas, vómito, fiebre, dolor muscular, dolor articular y pérdida de apetito.

Respecto a la susceptibilidad por raza, cabe señalar que se han realizado algunos estudios a fin de determinar la existencia de una relación entre la ehrlichiosis y

la raza de los perros, indicando que algunas de las razas más propensas a contraer la enfermedad son cocker spaniel, husky siberiano, pug y labrador (Cartagena, Ríos, & Cardona, 2015).

En Ecuador existen reportes de *E. canis* en las Islas Galápagos, donde se ha identificado mediante PCR y se determinó una prevalencia de 48.3% en una población de 58 canes (Jiménez, Mariño, Stapleton, Prieto, & Bowman, 2020). En la ciudad de Cuenca, la bacteria fue identificada mediante frotis sanguíneo (Dominguez, 2011) mientras que otro estudio realizado en las ciudades de Guayaquil y Manta ha reportado una prevalencia de 40% y 52% para *E. canis* respectivamente, tomando en cuenta una población de 50 canes en cada ciudad, para determinar esta prevalencia se tomaron muestras de sangre y se utilizó el kit SNAP® 4Dx® de diagnóstico serológico (McCown, Monterroso, & Grzeszak, 2011). Adicionalmente, un estudio realizado en perros de Portoviejo y Colón sobre coinfecciones de *Trypanosoma cruzi* con otras enfermedades transmitidas por vectores reportó una prevalencia de 48% para *Ehrlichia spp.* (Rivadeneira-Barreiro et al., 2021). Por otro lado, en un estudio realizado en 10 clínicas veterinarias de Santo Domingo se determinó una prevalencia de 7% para *E. canis*, a partir de diagnóstico serológico utilizando el kit SNAP® 4Dx® (Calvache, 2014).

A pesar de toda esta información veterinaria de la enfermedad y su presencia, hasta el presente en la región continental, no ha sido reportada la bacteria en publicaciones y tampoco se han realizado las caracterizaciones moleculares pertinentes.

Justificación del problema

Santo Domingo de los Tsáchilas es una provincia de clima tropical húmedo que cuenta con una temperatura promedio de 22 °C y una humedad relativa de 88% (GAD Municipal de Santo Domingo, 2015), estas condiciones favorecen la prevalencia durante

todo el año de la garrapata *R. sanguineus*, vector principal de *E. canis*, ya que esta puede desarrollarse bien en temperaturas para van desde 20 a 35 °C y condiciones de humedad relativa de 35% a 95% (Dantas-Torres, 2010).

Aunque no existe un registro exacto de cuántos perros abandonados existen a nivel mundial se estima que el número es bastante elevado (Langley, 2020). En Ecuador tampoco existe un registro de la cantidad de canes abandonados a nivel nacional, sin embargo, países como México han realizado estimaciones, determinando que en dicho país existe aproximadamente un 70% de canes en las calles (Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, 2021). Cabe señalar que estos canes son bastante susceptibles a contraer enfermedades, debido a la falta de higiene, mala alimentación y falta de atención médica adecuada a la que se encuentran expuestos (Jackman & Rowan, 2007).

En Santo Domingo, el albergue Narices Frías, también denominado “Refugio Charli” acoge mascotas callejeras y reportadas en casos de maltrato. Este albergue les proporciona un hogar temporal hasta que son adoptados. En ocasiones los canes llegan al refugio en malas condiciones, ya sea debido a daños físicos, por enfermedades o por infestaciones de pulgas o garrapatas.

Por otro lado, aunque los veterinarios de Santo Domingo han diagnosticado ehrlichiosis canina mediante diagnóstico clínico, aún no se ha realizado ningún tipo de prueba molecular para *E. canis* en la provincia.

En base a los antecedentes presentados, se planteó realizar un estudio a fin de determinar la presencia de la bacteria *E. canis* en el albergue Narices Frías, tomando en cuenta que en dicho refugio se acoge a animales rescatados de varios sectores de Santo Domingo. Además, se planteó realizar otro muestreo en la provincia de Manabí,

considerando que, debido a la cercanía entre estas dos provincias existe una gran facilidad de movilización y que en varias ciudades de Manabí se han reportado casos positivos para *E. canis*.

Objetivos

Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente *Ehrlichia canis* en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo en hematocitos de los caninos.
- Caracterizar molecularmente *Ehrlichia canis* en caninos provenientes del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas.
- Construir y analizar un árbol filogenético generado a partir de las muestras positivas para *Ehrlichia canis*.

Capítulo II

Revisión de literatura

Historia

La bacteria *E. canis* fue identificada por primera vez en canes de Argelia infectados con garrapatas en el año de 1935 por Donatien y Lestoquard, inicialmente fue denominada *Rickettsia canis*, sin embargo, este nombre fue cambiando en el año de 1945 por Moshkovskii quien sustituyó el nombre por el actual *Ehrlichia canis*, como un homenaje a Paul Ehrlich (Harrus & Waner, 2011). Durante la guerra de Vietnam la CME se volvió una enfermedad más conocida debido a que una gran cantidad de perros militares de las fuerzas armadas estadounidenses contrajeron la enfermedad y murieron (Huxsoll et al., 1970). Desde entonces la CME es considerada una importante enfermedad canina a nivel mundial (Sainz et al., 2015).

Adicionalmente, en el año 2001, Dumler et al. propusieron una nueva clasificación para algunas familias del orden Rickettsiales, estableciendo definitivamente la actual clasificación taxonómica para *E. canis* en la familia de las *Anaplasmatacea*.

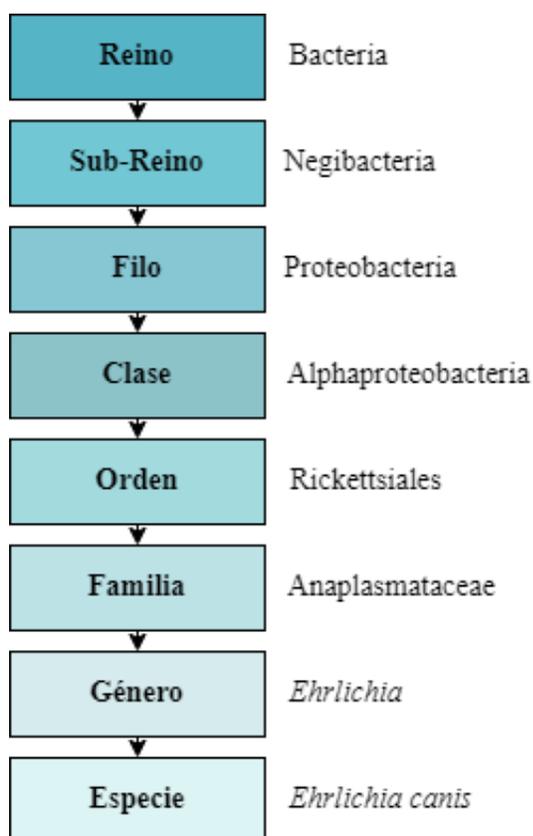
Cabe mencionar que la capacidad zoonótica de *E. canis* es controversial, dado que normalmente no infecta humanos, no obstante, en 1996 se reportó un agente similar a *E. canis* en un hombre de Venezuela, esta bacteria se consideró como nueva subespecie de *E. canis*. Otro aspecto que cabe mencionar es que, en años recientes, se ha identificado ADN de *E. canis* en la sangre de gatos en Canadá, Brasil y Portugal, sin embargo, los intentos de cultivar la bacteria a partir de los casos sospechosos no han sido exitosos. (Day, 2020)

Taxonomía

En cuanto a la taxonomía de *E. canis*, en el año 2001, se propuso y se aceptó una reorganización de las familias Rickettsiaceae y Anaplasmataceae dentro del orden Rickettsiales, donde se unificaron algunas especies de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Dumler et al., 2001). En la figura 1 se puede observar la clasificación taxonómica para *E. canis*.

Figura 1

Clasificación taxonómica según Dumler et al. (2001)



Morfología

E. canis son bacterias intracelulares, Gramnegativa y de aspecto cocoide, cuyas células diana son los monocitos y linfocitos. Estas bacterias poseen dos formas morfológicas las cuales pueden ser cuerpos elementales pequeños de 0,2 a 0,4 μm y

cuerpos reticulados grandes de 0,8 a 1,5 μm . A medida que la infección avanza, los cuerpos elementales se agrupan para producir la lisis celular a fin de liberar a las bacterias para infectar nuevas células (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

Distribución

E. canis se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, su distribución está asociada a su vector principal, *R. sanguineus*, que de igual manera presenta una distribución mundial, encontrándose en Europa, Asia, África, y América (Day, 2020), sin embargo, aunque este vector puede adaptarse bien a climas templados, generalmente su población es más densa en climas cálidos y húmedos (Estrada-Peña et al., 2004) señalando que varias regiones del Ecuador cuentan con este clima (Barros & Troncoso, 2012). Por otro lado, aunque muchos estudios afirman que la garrapata *R. sanguineus* no se encuentra en el continente oceánico, existe un estudio que reporta la existencia de *R. sanguineus* en Australia (Chandra et al., 2019) y de igual manera, en el año de 2020, el gobierno de los territorios del norte de Australia reportó la presencia de *E. canis* en dicho país (Northern Territory Government of Australia, 2020).

Transmisión

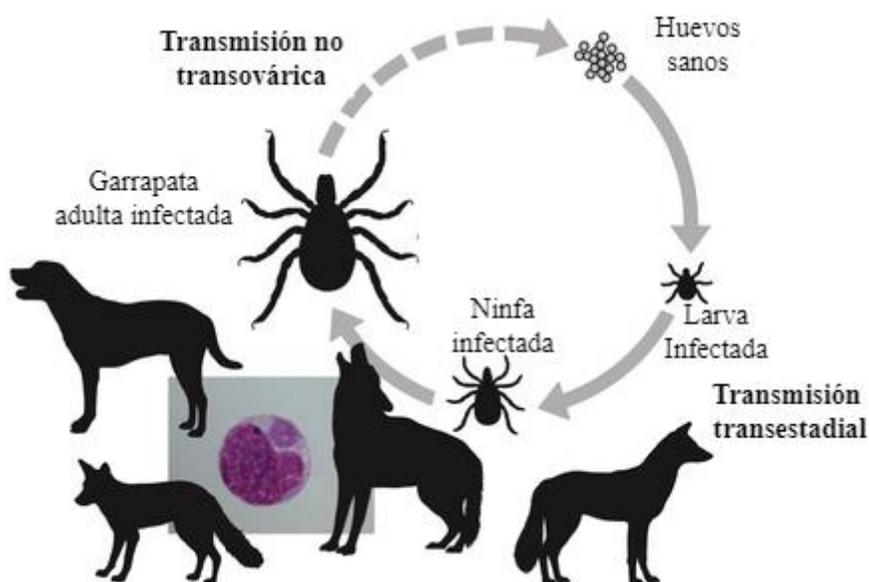
Como ya se mencionó anteriormente, *E. canis* es transmitida por la garrapata *R. sanguineus*, considerado el principal vector de esta bacteria. Sin embargo, de manera experimental también se ha transmitido mediante *Dermacentor variabilis*, aunque se considera que esta especie no desempeña un papel tan relevante como vector (Day, 2020).

Se considera que la transmisión de *E. canis* en la garrapata se produce de manera transtadial pero no transovárica, es decir, esta se transmite de larvas a ninfas y de ninfas a adultos pero no de hembras a su descendencia. Las larvas y ninfas de *R. sanguineus* contraen la infección al alimentarse de la sangre de perros bacteriémicos

(Day, 2020). Una vez que la garrapata se infecta, la bacteria llega al intestino, infecta las células epiteliales y se reproduce, para posteriormente distribuirse por el organismo y llegar nuevamente a las glándulas salivares, provocando la infección de nuevos hospedadores al momento que la garrapata vuelva a alimentarse (Font, Cairó, & Callés, 1988).

Figura 2

Ciclo de vida de *E. canis* en la garrapata *R. sanguineus* (Sykes, 2016)



Patogénesis

Una vez que la garrapata infecta con *E. canis* a un nuevo hospedador, inicia un período de incubación que puede durar de 8 a 20 días (Day, 2020). Durante este período, la bacteria ingresa al torrente sanguíneo y linfático, llegando a localizarse principalmente en el bazo e hígado. Una vez allí, la bacteria se adhiere a los monocitos y linfocitos (células diana) e ingresa por endocitosis. Cuando *E. canis* se encuentra dentro de la célula, permanece al interior de una vacuola donde se reproduce por fisión binaria hasta formar una mórula, la proliferación progresiva de la bacteria dentro de la

célula conduce posteriormente a una lisis celular, de manera que la bacteria es liberada a fin de infectar a nuevas células y diseminar la infección a otros órganos (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

Signos clínicos

En este caso, los signos clínicos de *E. canis* se asocian a las fases clínicas de la enfermedad, puede ser aguda, subclínica y crónica. (Rodríguez-Vivas, Bolio-González, & Ojeda-Chi, 2015). A continuación, se describen los signos clínicos para cada fase de la enfermedad.

Los signos clínicos en la fase aguda de la enfermedad son considerados mayormente inespecíficos, entre estos se encuentra la pérdida de peso, fiebre, apatía y decaimiento. Además, algunos canes pueden presentar sangrados y ocasionalmente epistaxis. Otros signos que pueden presentarse en esta fase son linfadenomegalia, esplenomegalia, petequias y equimosis de la piel y las membranas mucosas (Rodríguez-Vivas, Bolio-González, & Ojeda-Chi, 2015).

En la fase subclínica, los canes pueden permanecer infectados durante mucho tiempo sin desarrollar sintomatología, no obstante, pueden presentar trombocitopenia leve.

En cuanto a la fase crónica, la gravedad de la sintomatología puede variar en gran medida. Algunos de los síntomas característicos de esta fase son la pérdida de peso, fiebre, alteraciones hematológicas, debilidad, anorexia, palidez en las mucosas, depresión y edema periférico (Rodríguez-Vivas, Bolio-González, & Ojeda-Chi, 2015).

Adicionalmente existen signos oculares y neurológicos que pueden presentarse tanto en la fase aguda como en la crónica, sin embargo, la diferencia radica en la gravedad con que se presentan los síntomas en las dos fases. Entre estos signos se

encuentra la conjuntivitis, edema corneal, hipema, ataxia, hiperestesia, convulsiones y déficit de nervios craneales y signos vestibulares.

También cabe mencionar que, aunque los signos clínicos pueden variar dependiendo de la fase clínica de la enfermedad, existen otros factores que influyen en la manifestación de estos signos, como por ejemplo, la raza del can, puesto que existen razas que son más susceptibles a manifestar la fase crónica de la enfermedad, entre ellos, el pastor alemán, para los cuales la enfermedad aparenta ser más grave que en otras razas y registra una tasa de mortalidad más alta (Day, 2020).

Figura 3

Epistaxis en perro infectado con E. canis (Day, 2020)



Métodos de diagnóstico

Existen diferentes métodos de diagnóstico empleados para el diagnóstico de *E. canis*, a continuación, se presentan cuatro de estos métodos y sus características principales.

Diagnóstico mediante frotis sanguíneo

Es considerado un método directo de evaluación, para ello se toma una gota pequeña de sangre y se extiende sobre el portaobjeto, posteriormente, se deja secar y se tiñe la placa con giemsa a fin de llevar al microscopio y determinar mediante observación la presencia de mórulas dentro de los monocitos. Si bien este método de diagnóstico resulta económico, fácil y rápido, se considera que la búsqueda de mórulas en el microscopio puede resultar difícil, especialmente si no se tiene mucha práctica en esta técnica y se calcula que solo el 4% de los casos se tiene éxito en la búsqueda de mórulas y que en ocasiones las plaquetas y otras células pueden confundirse con los cuerpos de inclusión buscados (Harrus & Waner, 2011).

Diagnóstico serológico

Existen varios métodos de diagnóstico serológico para CME, entre las cuales se puede mencionar la prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) que permite detectar IgG anti-*E. canis*, además, esta es considerada la prueba de oro en cuando a diagnóstico serológico de *E. canis*, ya que permite detectar la exposición previa del can a la bacteria. En cuanto a los anticuerpos IgM, se considera que no son un indicador confiable para determinar una infección de *E. canis*, debido a que estos pueden tener un desarrollo irregular durante el transcurso de la enfermedad. (Harrus & Waner, 2011). Otro método de diagnóstico serológico que se puede mencionar es el ensayo inmunoenzimático (ELISA), cabe señalar que existe una gran cantidad de kits diseñados para facilitar el diagnóstico clínico a la vez que proporcionan una prueba sensible y específica (Day, 2020), entre los cuales se puede mencionar el kit SNAP 3Dx, que utiliza péptidos derivados de las principales proteínas de *E. canis* P30 y P30/31 y posee una especificidad de 98-100% (Harrus et al., 2002).

Diagnóstico molecular

En este caso, la PCR es una prueba muy sensible, capaz de detectar la presencia de la bacteria entre 4 y 10 días post-infección. Se considera que es posible que se den resultados falsos positivos cuando existe contaminación (Harrus & Waner, 2011), sin embargo, al realizar esta técnica siempre se debe tener el mayor cuidado posible para evitar la contaminación. Cabe mencionar que, para la detección de *E. canis* mediante ensayos de PCR los genes diana más utilizados son 16S rRNA y p30, esto debido a que *E. canis* cuenta con copias múltiples del gen p30 en su secuencia genómica, mientras que el gen 16S rRNA ha proporcionado información sobre diversas cepas y contiene una secuencia altamente conservada (Harrus & Waner, 2011).

Identificación de *E. canis* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) son una técnica molecular que permite identificar variaciones de secuencias de nucleótidos en fragmentos de ADN, basándose en la especificidad de las endonucleasas de restricción, estas enzimas cortan el fragmento de ADN únicamente en el sitio de reconocimiento (Mittal, Chaturvedi, & Tulsyan, 2013). Esta técnica puede ser utilizada para diferenciar dos organismos o especies y existen estudios donde se han utilizado para identificar especies del género *Ehrlichia spp* (Inokuma et al., 2001). Para realizar la identificación se puede utilizar un producto de PCR el cual se incuba con una enzima de restricción apropiada, la unión de la enzima de restricción a los sitios de reconocimiento dará como resultado fragmentos de diferentes tamaños que pueden ser observados mediante electroforesis en gel de agarosa (Berg, 2012).

Tratamiento

Se considera que durante las fases aguda y subclínica es posible administrar un tratamiento exitoso al can, sin embargo, la fase crónica de la enfermedad presenta un pronóstico grave y no se garantiza la eficiencia del tratamiento aplicado (Harrus, 2015).

Algunos fármacos como las tetraciclinas y el cloranfenicol han mostrado resultados positivos en tratamiento contra *E. canis*, siendo la doxiciclina uno de los fármacos más eficientes en el tratamiento contra la CME aguda. La mayoría de casos agudos presentan una mejoría después de 24 a 72 horas de haber recibido el tratamiento, no obstante, no en todos los casos se observa una mejoría inmediata. En el caso de los canes en fase subclínica, estos pueden requerir un tratamiento prolongado (Day, 2020).

Capítulo III

Materiales y métodos

Toma de muestras de sangre

Se tomaron un total de 102 muestras de sangre venosa de caninos, de las cuales 54 se obtuvieron del albergue “Narices Frías”, perteneciente al Municipio de Santo Domingo y ubicado en el Km 4.5 de la vía Santo Domingo – Chone. Se realizaron dos muestreos en diferentes fechas, donde se recolectaron 20 y 34 muestras respectivamente, tomando de 1 a 3 mL de sangre total (con anticoagulante) en cada ocasión.

Posteriormente, se realizó otro muestreo en un refugio canino dirigido por una voluntaria en la ciudad de Chone, donde se tomaron un total de 22 muestras y se obtuvieron 26 muestras adicionales provenientes de una clínica veterinaria de la parroquia Bahía de Caraquez, cantón Sucre.

Todas las muestras fueron trasladadas en un frío al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas sede Santo Domingo a fin de realizar los respectivos frotis y extracción de ADN.

Figura 4

Toma de muestra sanguínea en el albergue Narices Frías



Tinción de frotis sanguíneo

A partir de la sangre obtenida, se procedió a realizar los frotis, para lo cual, se colocaron 5 μL de sangre en un portaobjetos y con ayuda de otro portaobjetos en una inclinación de 45° , se extendió la muestra. Se dejó secar la muestra y luego se procedió a realizar la tinción, para lo cual, primeramente, se añadió metanol sobre la muestra y se dejó por 5 minutos, luego se añadió una solución de Giemsa:agua destilada (1:9) por 20 minutos y se procedió a lavar la muestra, se dejó secar y finalmente se procedió a observar con un aumento de 100X en un microscopio marca Euromex, modelo iScope.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se siguió un protocolo del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado (Riera, Rojas, & Zapata, 2010).

El primer paso fue transferir 500 μL de sangre total a un vial de 1,5 μL . A continuación, se añadió 540 μL de Buffer GR, se homogenizó en el vórtex y se llevó a centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se repitió tres veces el lavado con buffer GR. El siguiente paso fue añadir 180 μL de buffer GB y 20 μL de proteinasa K. Luego, se agregó 6 μL de SDS al 20% y se homogenizó

con el vórtex. Las muestras se llevaron a incubar a 56 °C en baño María durante 2 horas. Se dejó enfriar y a continuación se añadió 90 µL de AcK (acetato de potasio) 3M y se homogenizó suavemente. Se llevó a centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y con la ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado con AcK y luego de recuperar nuevamente el sobrenadante se añadió 600 µL de etanol absoluto. Se dejó incubar a -20 °C durante media hora, luego se llevó a centrifugar a 13000 rpm por 50 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación, se lavó el pellet con 100 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet a 37 °C y se resuspendió el pellet en 50 µL de buffer TE. Finalmente, se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos y se almacenó a -20 °C.

En la tabla 1, se muestra la información de los reactivos y concentraciones utilizadas para preparar los buffers GR y GB.

Tabla 1

Reactivos utilizados para la preparación de los buffers

| Buffer | Reactivo | Concentración |
|---------------|-----------------|----------------------|
| GR | Tris-HCl | 10 mM (pH 8.0) |
| | Tritón X-100 | 1% (v/v) |
| | Sacarosa | 600 mM |
| GB | Tris-HCl | 10 mM (pH 8.0) |
| | NaCl | 400 mM |
| | EDTA | 2 mM |

Determinación de la calidad del ADN

La calidad del ADN obtenido se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v). Para preparar el gel se diluyó 0.4 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X y se agregó 5 µL de bromuro de etidio a fin de visualizar la banda de ADN en el gel. Posteriormente se cargaron las muestras en los pocillos, para lo cual se mezcló 3 µL de ADN con Blue Juice 2X (1:1), debido a que únicamente se pretendía determinar la presencia y calidad de ADN genómico, no se utilizó un marcador de peso molecular. Se dejó correr el gel durante 45 minutos a 100 Voltios y se observó el gel con luz UV en el transiluminador Spectroline modelo TVD-1000R Bi-O-Vision.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para *Ehrlichia spp.*

En la prueba de PCR para detección de *Ehrlichia spp.* se amplificó el gen ARN ribosomal 16S (16S rRNA) utilizando los primers genéricos EHR16SF (5'-GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC-3') y EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3'). También cabe mencionar que para esta PCR se utilizó como control positivo una muestra de *A. marginale* obtenida en la ciudad de Calceta como parte del proyecto de investigación BruTryp. Cabe mencionar que se utilizó este control positivo debido a que *Ehrlichia* y *Anaplasma* tienen secuencias conservadas y los primers EHR16S también han sido usados para detección de *Anaplasma* (Inokuma, Raoult, & Brouqui, 2000; Parola et al., 2000). Las condiciones de los reactivos para la PCR se detallan en la tabla y para establecer las condiciones del termociclador se siguió un protocolo modificado de Inokuma, Raoult & Brouqui (2000).

Tabla 2*Reactivos y condiciones de la PCR para amplificación de 16S rRNA en Ehrlichia spp*

| Reactivo | Unidad | Stock | Concentración Final | Volumen (µL) |
|---------------------------|--------|-------|---------------------|--------------|
| H ₂ O | µL | | | 18,38 |
| Buffer+ MgCl ₂ | X | 10,00 | 1,00 | 2,50 |
| EHR16SF | µM | 10,00 | 0,50 | 1,25 |
| EHR16SR | µM | 10,00 | 0,50 | 1,25 |
| dNTP | µM | 10,00 | 0,20 | 0,50 |
| Taq | U/ µL | 5,00 | 0,63 | 0,13 |
| ADN | ng | | | 1,00 |
| Volumen total | | | | 25,00 |

Para realizar la PCR se programó un termociclador marca Thermo electron corporation modelo PX2 Thermal Cycler, estableciendo una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos. Se establecieron 40 ciclos donde las condiciones fueron de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto. La extensión final se realizó a 72 °C durante 10 minutos.

Para visualizar los productos de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v). Para ello, se diluyó 1 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X y se

agregó 5 µL de bromuro de etidio. Posteriormente, se tomaron 10 µL de producto de PCR y se mezcló con Blue Juice 2X (1:1) y se cargó en el gel, en este caso, para conocer el tamaño del fragmento amplificado, se cargó 5 µL del marcador de peso molecular de 100 pb de la marca abm. El gel se dejó correr por 45 minutos a 100 Voltios y se observó con luz UV en el transiluminador.

Identificación de *E. canis* mediante digestión con enzimas de restricción (RFLP)

Considerando que los primers utilizados no eran específicos para *E. canis* y podían amplificar otras especies de *Anaplasmatacea* se planteó realizar un PCR-RFLP, donde los productos de PCR identificados como positivos, fueron digeridos con una enzima de restricción para diferenciar si el amplicón pertenece a *E. canis* o a *A. platys*. Para ello, primeramente, se identificó la secuencia de *E. canis* amplificada por los primers EHR16SF y EHR16SR, utilizando las herramientas bioinformáticas Blast y Bioinformatics Sequence Extractor, de igual manera se buscó la secuencia de *A. platys* que también podía ser amplificada con dichos primers. Posteriormente, se utilizó la herramienta RestrictionMapper para identificar la enzima HindIII que cortaba el amplicón de *E. canis* en dos fragmentos de 132 y 194 pb (figura 5).

Figura 5

Corte del fragmento de E. canis obtenido con la enzima de restricción HindIII

Enzymes: HindIII

| Length | 5' Enzyme | 5' Base | 3' Enzyme | 3' Base | Sequence |
|--------|-----------|---------|-----------|---------|--|
| 194 | HindIII | 133 | none | 326 | AGCTTAACTT TGGAGCGGCT TTTAATACTG CTAGACTAGA GGTCGAAAAGA GGATAGCGGA ATTCTAGTG TAGAGGTGAA ATTCGTAGAT ATTAGGAGGA ACACCAGTGG CGAAGGCGGC TATCTGGTTC GATACTGACA CTGAGGTGCC AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACG |
| 132 | none | 1 | HindIII | 132 | GGTACCTATA GAAGAAGTCC CGGCAAACCTC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGGGG GCAAGCGTTG TTCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGCACGTA GGTGGACTAG TAAGTAAAA GTGAAATACC AA |

Una vez identificada la enzima de restricción apropiada para identificar *E. canis*, se obtuvo la enzima HindIII de la marca Promega y se procedió a preparar un mix con los reactivos necesarios para la digestión enzimática, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Promega Corporation, 2011). En este caso, también se utilizó un control positivo a fin de establecer que la enzima estaba realizando la digestión correctamente, el control utilizado fue un producto de PCR de *A. marginale* donde se amplificó el gen *msp5*, este fragmento cuenta con sitios de reconocimiento para HindIII.

Tabla 3

Reactivos utilizados en la digestión con enzima HindIII para identificación de E. canis

| Reactivo | Unidad | Stock | Volumen (µL) |
|----------------------|---------------|--------------|---------------------|
| H ₂ O | µL | N/A | 1,80 |
| Buffer E | X | 10,00 | 2,00 |
| HindIII | U/ µL | 10,00 | 1,00 |
| BSA | µg/ µL | 10,00 | 0,20 |
| Producto PCR | µg/ µL | | 15 |
| Volumen total | | | 20 |

Una vez preparado el mix, se procedió a incubar las muestras en un baño maría a 37 °C durante 4 horas. Finalmente, para observar los productos de digestión obtenidos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 4%, durante 1 hora a 100 Voltios y se visualizó el resultado en el transiluminador.

Diagnóstico de la prevalencia de *E. canis*

La prevalencia permite medir el porcentaje de población que presenta una afección. En este caso, para realizar el cálculo se tomó en cuenta el número total de individuos positivos para *E. canis* dentro del total de individuos muestreados.

El cálculo de la prevalencia se realizó por ciudad, obteniendo prevalencias individuales para Santo Domingo, Chone y Sucre.

$$\textit{Prevalencia} = \frac{\textit{Total de individuos positivos}}{\textit{Total de muestreo}}$$

Capítulo IV

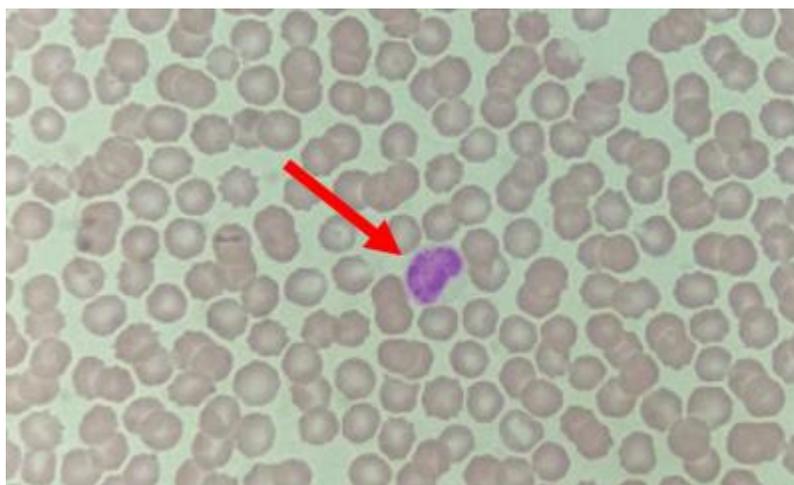
Resultados

Frotis sanguíneo

Se realizó frotis sanguíneo y tinción con giemsa de todas las muestras obtenidas. Sin embargo, en ninguna muestra se logró identificar una mórula que permitiera determinar la presencia de *E. canis* en los animales. No obstante, se observaron las células diana de la bacteria, en este caso los monocitos y linfocitos y se determinó que estos presentaban un aspecto normal.

Figura 6

Monocito en frotis sanguíneo



Nota: Monocito observado con un aumento de 100X en tinción giemsa.

Extracción de ADN

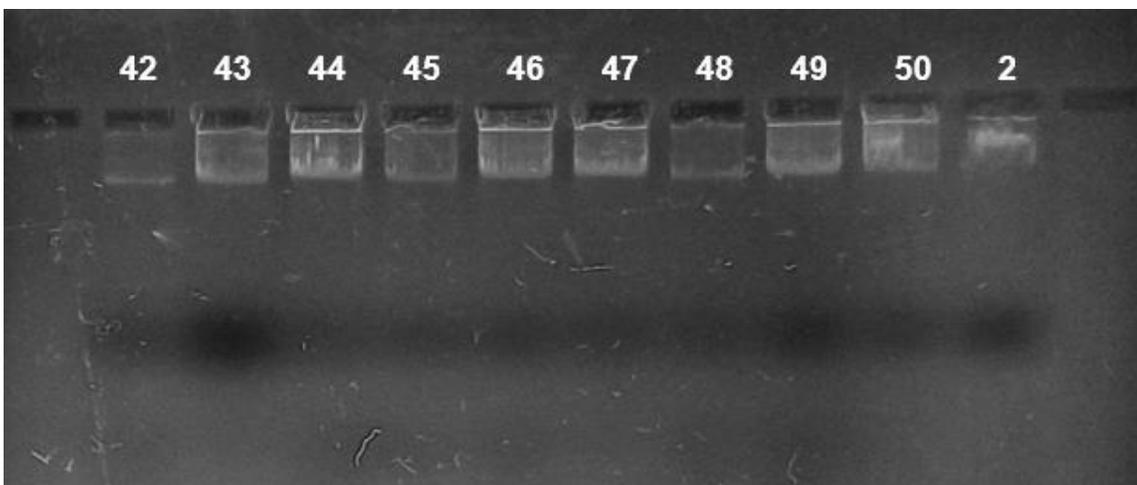
Se logró extraer ADN de todas las muestras a excepción de una, debido a que inicialmente no se logró obtener suficiente sangre del can y al realizar la primera extracción se acabó la muestra sin lograr obtener ADN, no fue posible tomar otra

muestra de sangre del can debido a que este fue adoptado después del primer muestreo.

Se realizaron varias extracciones de ADN. Para comprobar la calidad del ADN obtenido se empleó la técnica de electroforesis en gel agarosa, a partir de la cual se logró observar la presencia de bandas bien definidas de ADN genómico en todos los pocillos donde se habían cargado muestras. En la figura 6, se puede observar las bandas en el gel de agarosa que indican la presencia de ADN genómico.

Figura 7

ADN genómico obtenido de canes del albergue Narices Frías



Nota: Los números corresponden a la numeración utilizada para identificar a los individuos muestreados

Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR

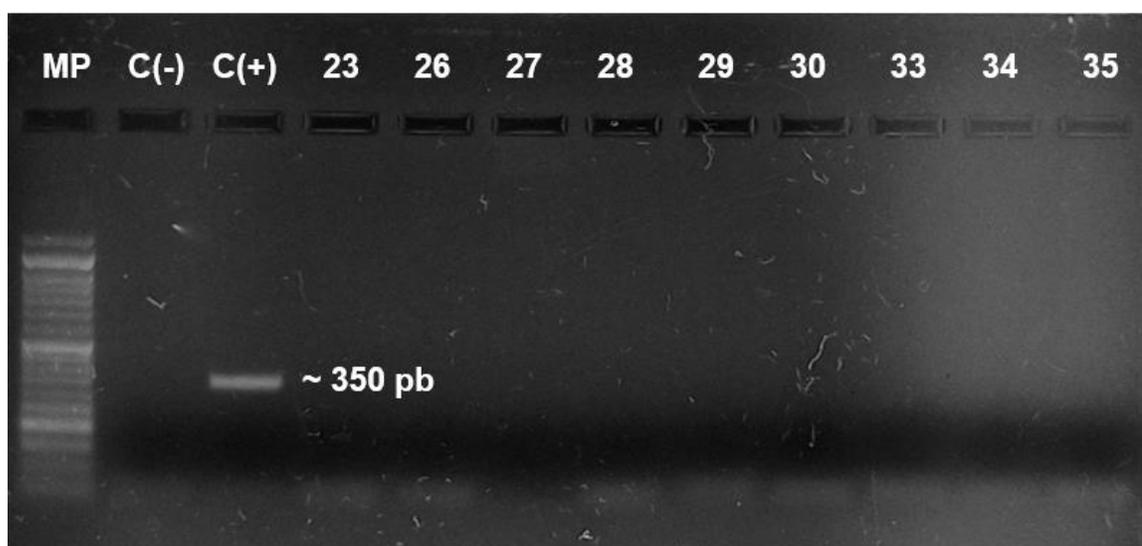
Luego de realizar la PCR de todas las muestras y observar el producto obtenido, se determinó que no se logró amplificar el gen 16S rRNA en ninguna de las muestras obtenidas del albergue Narices Frías (Figura 8), de igual manera para las muestras procedentes del cantón Sucre. Sin embargo, en el caso de las muestras obtenidas del

cantón Chone sí se logró amplificar el gen diana, obteniendo un total de 10 productos de PCR amplificados de un tamaño de aproximadamente 350 pb.

En el caso de las 10 muestras positivas tomadas en Chone, fue necesario realizar un PCR-RFLP a fin de lograr identificar la presencia de *E. canis*, considerando que los primers utilizados en la PCR también podían amplificar *Anaplasma*.

Figura 8

Producto de PCR correspondiente a las muestras del albergue Narices Frías

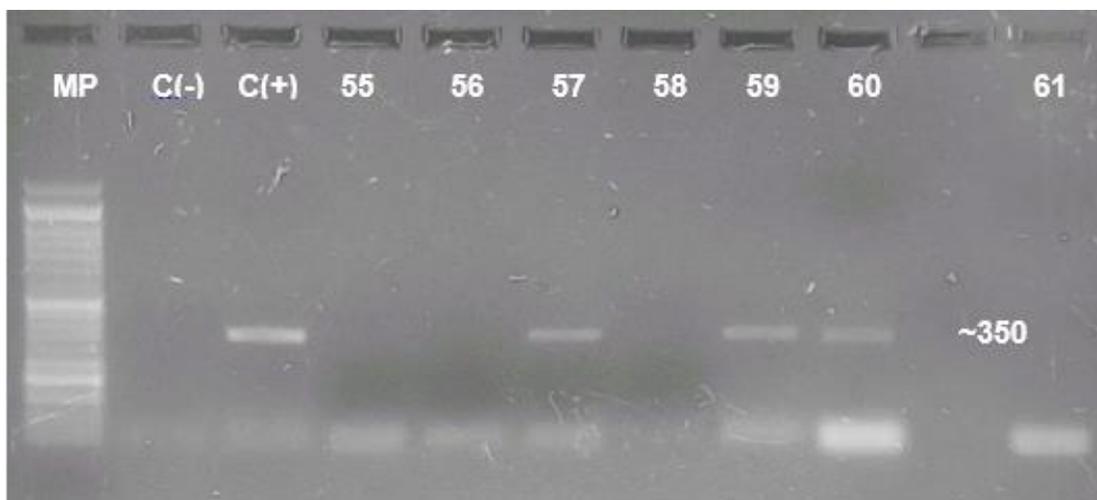


Nota: MP: Marcador de peso molecular, C(-): Control negativo, C(+): Control positivo; los números corresponden a los individuos participantes del muestreo

En las figuras 9, 10 y 11 se puede observar la presencia de bandas correspondientes a un fragmento de ADN de aproximadamente 350 pb amplificado con los primers EHR16S. Estos amplicones se observan en las muestras 57, 59, 60, 62, 65, 66, 67, 68, 72 y 75.

Figura 9

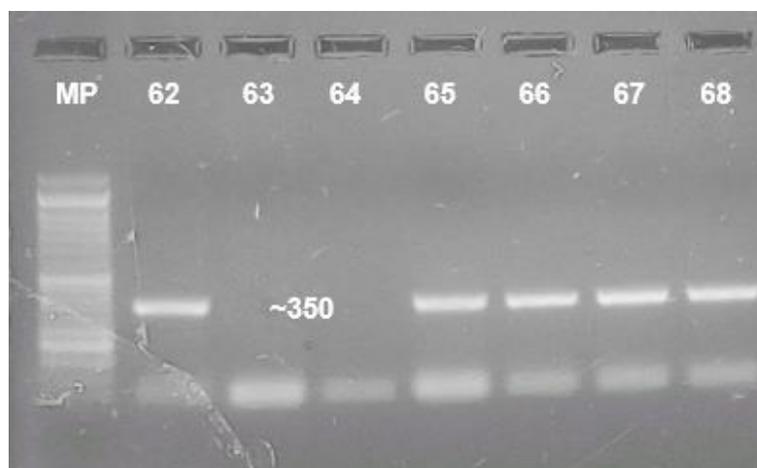
Producto de PCR correspondiente a las muestras 55 a 61 obtenidas en Chone



Nota: MP: Marcador de peso molecular, C(-): Control negativo, C(+): Control positivo; muestras 57, 59 y 60 positivas; muestras 55, 56, 58 y 61 negativas.

Figura 10

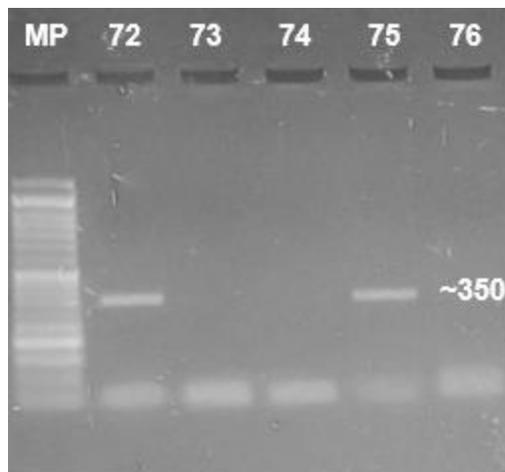
Producto de PCR correspondiente a las muestras 62 a 68 obtenidas en Chone



Nota: MP: Marcador de peso molecular; muestras 62, 65, 66, 67 y 68 positivas; muestras 63 y 64 negativas.

Figura 11

Producto de PCR correspondiente a las muestras 72 a 76 obtenidas en Chone



Nota: MP: Marcador de peso molecular; muestras 72 y 75 positivas; muestras 73, 74 y 76 negativas.

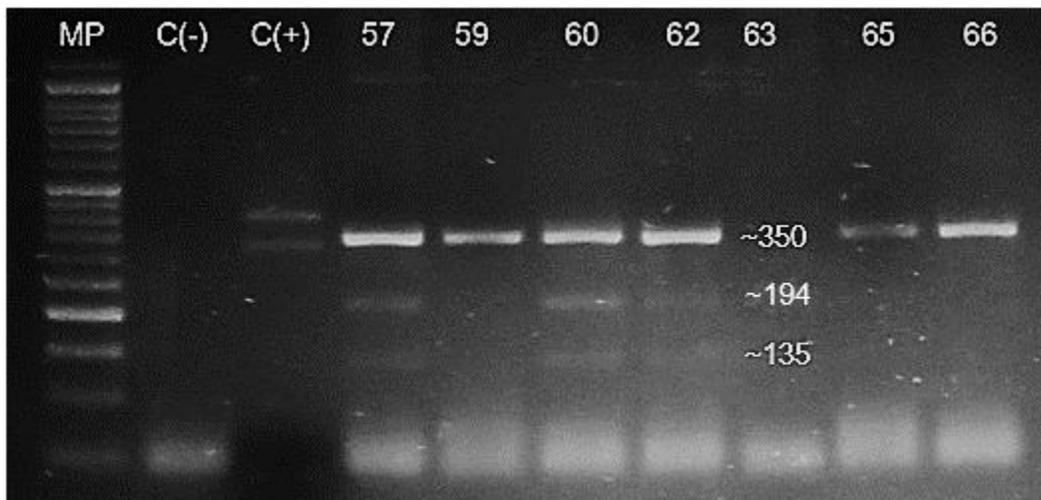
Identificación de *E. canis* mediante PCR-RFLP

Al realizar la digestión de los productos de PCR positivos con la enzima HindIII, se logró visualizar en todas las muestras una banda correspondiente al producto de PCR sin digerir de aproximadamente 350 pb y en tres muestras se observaron dos bandas adicionales de aproximadamente 135 pb y 194 pb correspondientes a los RFLP. Así mismo, se observó el control positivo con los RFLP correspondientes, esto permitió determinar que la digestión enzimática se realizó correctamente.

De esta manera, se logró establecer que aquellas muestras donde se observaban fragmentos de aproximadamente 135 pb y 194 pb, correspondían a muestras digeridas con HindIII y positivas para *E. canis*, en este caso, las muestras 57, 60 y 62.

Figura 12

Producto obtenido a partir de la digestión con la enzima HindIII



Nota: MP: Marcador de peso molecular, C(-): Control negativo, C(+): Control positivo; 57 positivo, 59 negativo, 60 positivo, 62 positivo tenue, 63 negativo, 65 negativo, 66 negativo.

Prevalencia de *E. canis* en los cantones muestreados

Tomando en cuenta que el total de muestras positivas fue 0 y el total de canes muestreados fue de 54, se calculó la prevalencia de *E. canis* dentro del albergue Narices Frías. Al aplicar la fórmula, se obtuvo como resultado una prevalencia del 0% a la fecha que se realizó el muestreo.

Para las muestras obtenidas del cantón Sucre, se determinó igualmente una prevalencia de 0% debido a que no se encontraron casos positivos.

En el caso del cantón Chone, se determinó una prevalencia del 13,64% al haber identificado un total de 3 casos positivos para *E. canis* en un total de 22 canes muestreados en dicho cantón.

Tabla 4*Prevalencia de E. canis en tres cantones del Ecuador*

| Cantón | Animales muestreados | Casos Positivos | Prevalencia (%) |
|----------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| Santo Domingo | 54 | 0 | 0 |
| Chone | 22 | 3 | 13,64 |
| Sucre | 26 | 0 | 0 |
| Total | 102 | | |

Capítulo V

Discusión

Aunque el diagnóstico mediante frotis sanguíneo no se considerada una prueba muy sensible para detección de *E. canis* (Harrus, 2015). Se logró realizar correctamente la técnica y también se logró visualizar correctamente las estructuras celulares. Un aspecto a destacar del diagnóstico mediante frotis sanguíneo es que permite la evaluación de coinfecciones causadas por otros patógenos transmitidos por garrapatas y que pueden influir en la manifestación de la enfermedad (Gal et al., 2007). Por otro lado, cabe señalar que a pesar de que se logró detectar casos positivos para *E. canis*, no fue posible identificar la mórula en los frotis correspondientes, determinando que el diagnóstico por frotis no es un método tan confiable y que resulta difícil identificar los cuerpos de inclusión ya que pueden ser confundidos fácilmente con otras estructuras celulares (Harrus & Waner, 2011).

Respecto a los resultados obtenidos por PCR del albergue Narices Frías y del cantón Sucre, se podría considerar que es posible que la prueba presentase falsos negativos, teniendo en cuenta que algunos factores como la temperatura o la contaminación podrían ocasionar resultados falsos (Harrus, 2015). Sin embargo, estas opciones quedan descartadas al momento que en la prueba se observa el control positivo de manera correcta, considerando que, en caso de fallos de temperatura, el control positivo tampoco amplificaría. En base a esto, se descarta la posibilidad de que los resultados obtenidos sean producto de un falso negativo y se determina que los canes del albergue Narices Frías no estaban infectados con *E. canis*, al igual que en las muestras procedentes del cantón Sucre.

Por otra parte, de las muestras obtenidas en Chone se logró amplificar un fragmento de ADN en 10 muestras, sin embargo, no se considera que todas estas muestras sean positivas para *E. canis*, ya que los primers utilizados en esta PCR (EHR16S) no son específicos para esta especie de *Ehrlichia*, sino que también pueden amplificar *A. platys* (Inokuma, Raoult, & Brouqui, 2000). Por lo cual, para identificar *E. canis* en la población muestreada, fue necesario realizar la prueba de PCR-RFLP ya que esta técnica resultaba bastante sencilla de ejecutar y proporcionaba resultados confiables (Mittal, Chaturvedi, & Tulsyan, 2013). En este caso, utilizando distintas herramientas bioinformáticas, se logró determinar que la enzima HindIII era capaz de diferenciar *E. canis* de *A. platys*, ya que, esta enzima contaba con un sitio de reconocimiento únicamente para el fragmento de *E. canis* amplificado con los primers EHR16S. Una vez realizado el PCR-RFLP se logró identificar la presencia de tres muestras positivas para *E. canis* en una población total de 22 animales. Esto permitió corroborar la presencia de *E. canis* en la provincia de Manabí, donde anteriormente, ya se habían reportado casos positivos determinados por serología en la ciudad de Portoviejo (Rivadeneira-Barreiro et al., 2021).

En cuanto a la prevalencia de la enfermedad, se determinó que en las ciudades de Santo Domingo y Sucre fue de 0%, debido a que no se encontró ninguna muestra positiva, sin embargo, esto no implica que la población del refugio Narices Frías o del cantón Sucre no puedan infectarse en un futuro, cabe recordar que la prevalencia indica el total de casos positivos en una población y tiempo determinado. Por otro lado, la prevalencia calculada para la ciudad de Chone fue de 13,64%, señalando que en un estudio realizado en la ciudad de Manta se reportó una prevalencia del 52% para *E. canis* (McCown, Monterroso, & Grzeszak, 2011), sin embargo, es posible reducir esta

prevalencia, aplicando el tratamiento adecuado a los animales, de manera que disminuyan los casos positivos.

Finalmente, aunque no se logró encontrar ninguna muestra positiva para *E. canis* en Santo Domingo y en Sucre, no se puede descartar la presencia de la bacteria, considerando que, en Chone, lugar cercano tanto a Santo Domingo como a Sucre, si se lograron encontrar casos positivos. De igual manera, cabe mencionar que existe evidencia que indica que esta bacteria ha sido reportada en las Islas Galápagos, considerada una región donde se trata de evitar especies invasoras (Jiménez, Mariño, Stapleton, Prieto, & Bowman, 2020). Sería interesante poder seguir realizando estudios a fin de lograr obtener muestras positivas de distintas provincias del país para posteriormente, realizar la secuenciación de estas muestras y crear un registro que identifique cual es o cuales son las cepas existentes en el país, su genotipo y su distribución a nivel nacional. Cabe señalar que en Brasil existe un estudio donde se lograba establecer la distribución geográfica de *E. canis* y sus distintas cepas en su territorio nacional (Gonçalves et al., 2020).

Capítulo VI

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En este estudio se pudo descartar la presencia actual de *E. canis* en el albergue canino Narices Frías, debido a que los resultados tanto del diagnóstico por frotis como el diagnóstico por PCR fueron negativos. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de *E. canis* en Santo Domingo ya que existe evidencia clínica del diagnóstico de ehrlichiosis por parte de algunos veterinarios de la ciudad. De igual manera, se descartó la presencia de *E. canis* en las muestras obtenidas del cantón Sucre. Por otro lado, en el refugio de la ciudad de Chone, se identificaron 3 casos positivos para *E. canis* mediante PCR y RFLP, pero no se logró realizar el diagnóstico por frotis.

Se logró realizar de manera adecuada los frotis y tinción giemsa de los mismos, se logró identificar en el microscopio las células diana de *E. canis*, pero no se identificaron mórulas de la bacteria, por lo cual se determinó que el diagnóstico por frotis no es muy confiable y se requiere bastante práctica para poder realizar un diagnóstico confiable mediante esta técnica.

Se logró realizar exitosamente la extracción de ADN ya que, al momento de realizar la electroforesis para verificar la calidad del ADN, se pudo observar la presencia de una banda muy marcada. De igual manera se realizó exitosamente la PCR, debido a que los controles positivos utilizado se observó en todas las pruebas. Mediante PCR se logró obtener un fragmento amplificado en 10 muestras, sin embargo, al realizar la identificación de *E. canis* mediante PCR-RFLP se determinaron únicamente 3 casos positivos.

La prevalencia de *E. canis* actualmente es de 0% en el albergue Narices Frías de Santo Domingo y en el cantón Sucre, pero no se puede descartar un futuro brote de la enfermedad dentro del albergue, aún más teniendo en cuenta que algunos canes rescatados pueden llegar al refugio con garrapatas portadoras de la bacteria. En el caso del cantón Chone, se determinó una prevalencia del 13,64% que puede ser reducida si a los animales infectados se les aplica el tratamiento adecuado.

Recomendaciones

Se recomienda realizar más muestreos en diversos sectores de la provincia, incluyendo sectores rurales, a fin de tener una población de estudio más grande y enfocándose especialmente en canes que hayan estado en contacto con garrapatas. Incluso se podría realizar muestreos en otras provincias del país a fin de realizar un reporte que compruebe la existencia de la enfermedad en el país que sirvan como base para futuras investigaciones.

Se recomienda realizar controles de garrapatas en los canes, ya que, independientemente de su raza, sexo o edad, pueden ser infectados fácilmente por este ectoparásito y contraer la enfermedad.

Se recomienda ser más cuidadoso al momento de realizar la extracción de ADN, a fin de evitar las pérdidas de muestras y asegurar la obtención de un ADN de buena calidad.

Se recomienda mantener bajo vigilancia a los albergues caninos de Santo Domingo, ya que, si bien los resultados indicaban que el refugio se encontraba libre de la enfermedad, es posible que en cualquier momento llegue un can al albergue portando garrapatas infectadas.

Se recomienda aplicar el tratamiento pertinente a los canes infectados con *E. canis* a fin de evitar que se siga propagando la infección a otros canes y reducir la prevalencia de *E. canis* dentro del albergue.

Capítulo VII

Bibliografía

- Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies .
(2021). *Día Mundial del Perro Callejero; más razones para adoptarlos*. Obtenido de Boehringer Ingelheim México: <https://www.boehringer-ingelheim.mx/nota-prensa/dia-mundial-del-perro-callejero-mas-razones-para-adoptarlos>
- Barros, J., & Troncoso, A. (2012). *Atlas climatológico del Ecuador*. Quito. Obtenido de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1720/1/CD-2755.pdf>
- Berg, H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. En *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (págs. 316-319). doi:doi:10.5772/37724
- Calvache, H. (2014). *Identificación de hemoparásitos mediante "Snap diagnóstico 4dx Plus" (idexx) en caninos comprendidos entre dos meses a doce años De edad, en clínicas veterinarias urbanas de la ciudad de Santo domingo de los Tsáchilas*. Obtenido de Universidad De Las Americas: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2941>
- Cartagena, L. M., Ríos, L. A., & Cardona, J. A. (2015). Seroprevalencia de Ehrlichia canis en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Revista de Medicina Veterinaria*, (29) 51-62.
- Chandra et al. (2019). The brown dog tick Rhipicephalus sanguineus sensu Roberts, 1965 across Australia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. Obtenido de doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101305

- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 1-11. doi:10.1186/1756-3305-3-26
- Day, M. (2020). Ehrlichiosis and Anaplasmosis. En *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat* (págs. 167-174). Bristol: CRC Press.
- Dominguez, D. (2011). *Prevalencia e identificación de hemoparásitos (Ehrlichia canis, Babesia canis y Anaplasma phagocytophilum) en perros de la ciudad de Cuenca*. Obtenido de Tesis Medicina Veterinaria, Universidad de Cuenca, Facultad Cienc Agropec:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3024/1/tv199.pdf>
- Dumler et al. (2001). 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2145–2165.
- Estrada-Peña et al. (2004). *Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species*. International Consortium on Ticks and Tick Borne Diseases.
- Font, J., Cairó, J., & Callés, A. (1988). Ehrlichiosis canina. *Revista de AVEPA*, 141-148.
- GAD Municipal de Santo Domingo. (2015). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial I PDOT 2030*. Obtenido de
[https://www.santodomingo.gob.ec/docs/transparencia/2018/05-Mayo/Anexos/s\)/PDOT%202030/PDOT%202030%20SANTO%20DOMINGO.pdf](https://www.santodomingo.gob.ec/docs/transparencia/2018/05-Mayo/Anexos/s)/PDOT%202030/PDOT%202030%20SANTO%20DOMINGO.pdf)

- Gal et al. (2007). Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 619–622.
- Gonçalves et al. (2020). Geographic Distribution of Ehrlichia canis TRP Genotypes in Brazil. *Veterinary sciences*, 7 (4), 165. doi:10.3390/vetsci7040165
- Harrus. (2015). Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *The Veterinary Journal* 204 (3), 239-204. doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.027
- Harrus et al. (2002). Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis. *Veterinary Microbiology*, 86, 361–368.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292–296.
- Huxsoll et al. (1970). Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia. *Journal of Wildlife Diseases*, 6(4), 220–225. doi:10.7589/0090-3558-6.4.220
- Inokuma et al. (2001). Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3031–3039. doi:10.1128/JCM.39.9.3031-3039.2001
- Inokuma, H., Raoult, D., & Brouqui, P. (2000). *Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan*. Obtenido de J Clin Microbiol. 2000;38(11): doi:10.1128/JCM.38.11.4219-4221.2000

- Jackman, J., & Rowan, A. (2007). Free-roaming dogs in developing countries: The benefits of capture, neuter, and return programs. En D. Salem, & A. Rowan, *The state of the animals* (págs. 55-78). Washington, D.C: Humane Society Press.
- Jiménez, I. A., Mariño, P. A., Stapleton, G. S., Prieto, J., & Bowman, D. D. (2020). *Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos*. Obtenido de Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports: doi:10.1016/j.vprsr.2020.100373
- Langley, L. (2020). *Stray dogs have the natural ability to understand human gestures*. Obtenido de National Geographic: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/stray-dogs-communication-rabies-health>
- McCown, M., Monterroso, V., & Grzeszak, B. (2011). *Surveillance of zoonotic and infectious diseases in Ecuador: implications for special operations forces medical operations, personnel, and canines*. Obtenido de Journal of Special Operations Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173599/>
- Mittal, B., Chaturvedi, P., & Tulsyan, S. (2013). Restriction Fragment Length Polymorphism. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 190–193. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.01314-0
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Medical Microbiology*. Elsevier.
- Northern Territory Government of Australia. (2020). *Detection of ehrlichiosis in Northern Territory dogs*. Obtenido de Department of Primary Industry and Resources: <https://newsroom.nt.gov.au/article?id=33429>

Parola et al. (2000). Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 707–708.

Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90243-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90243-8)

Perez, M., Rikihisa, Y., & Wen, B. (1996). Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol*, 34 (9).

Obtenido de doi:10.1128/jcm.34.9.2133-2139.1996

Promega Corporation. (2011). *Assembly of Restriction Enzyme Digestions*. Obtenido de www.promega.com

Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología* (14), 4–7.

Rivadeneira-Barreiro et al. (2021). Trypanosoma cruzi co-infections with other vector borne diseases are frequent in dogs from the pacific coast of Ecuador. *Microbial Pathogenesis*, 155. doi:10.1016/j.micpath.2021.104884

Rodríguez-Vivas, R., Bolio-González, M., & Ojeda-Chi, M. (2015). Diagnóstico de la ehrlichiosis monocítica canina: una revisión actualizada. *Ciencia y Agricultura*, 12(1), 83-96.

Sainz et al. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites Vectors*, 8, 75. doi:10.1186/s13071-015-0649-0

Sykes, J. (2016). *Chapter 28: Ehrlichiosis*. Obtenido de Veterian Key:

<https://veteriankey.com/ehrlichiosis/>