

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Posgrados**

**Detección e identificación de *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp. en perros domésticos de varias comunidades rurales del Ecuador**

**Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación**

**Gabriela Estefanía Ortiz Chalá**

**Verónica Barragán, Ph.D.**

**Patricio Rojas Silva, M.D., Ph.D.**

**Directores de Trabajo de Titulación**

Quito, 18 diciembre 2023

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO DE POSGRADOS**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección e identificación de *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp. en caninos domésticos de varias comunidades rurales del Ecuador**

**Gabriela Estefanía Ortiz Chalá**

Nombre del Director del Programa: Patricio Rojas-Silva  
Título académico: M.D., PhD.  
Director del programa de: Maestría en Microbiología

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

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

**Quito, 18 diciembre 2023**

## © DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombre del estudiante: Gabriela Estefanía Ortiz Chalá

Código de estudiante: 00326734

C.I.: 1711716629

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2023

## ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

## UNPUBLISHED DOCUMENT

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

## DEDICATORIA

El haber llegado a culminar este trabajo de investigación no es un mérito individual, muchas personas me ayudaron en este arduo camino. Mi madre, mi padre, mi tía Angee, Valentín, Cinthya, Karlita siempre dispuestos a ayudarme para poder avanzar un peldaño día a día. Mis compañeros primero, luego algunos se convirtieron en mis amigos. Pame gracias por enseñarme a pipetear. Vero siempre creíste en mí, Pato gracias. A mi sobrina, mi más grande amor en la vida, Faby. Y aunque parezca un cliché, mi mayor dedicatoria es para Dios, quien me ha visto llorar, reír, un día odiar y otro día amar. Si alguien sostuvo mi mano todo este tiempo ha sido él (Mateo 28:20).

## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la Universidad San Francisco De Quito (USFQ) por recibirme como estudiante de Maestría, a los miembros del Instituto de Microbiología (IM) por enseñarme todo lo que ahora sé y apoyar esta investigación. A Eduardo Díaz, MDV, PhD., a Carolina Sáenz MDV, a Verónica Barragán, PhD., a Patricio Rojas, MD, PhD. A todos los miembros del Proyecto de Leptospirosis: Pamela Mosquera, Sebastián Melo, Diego Guzmán, Santiago Andrade. Al grupo del Centro de Bioinformática: Mateo Carvajal, Rommel Guevara, Érika Muñoz.

## Resumen

Los hemoparásitos se pueden transmitir a través de vectores artrópodos y reservorios, pudiendo causar en los individuos enfermedad leve o grave. El objetivo del estudio fue detectar e identificar dos hemoparásitos en perros domésticos, *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp., en muestras de sangre en diferentes zonas rurales del Ecuador. La recolección de muestras se realizó en Manabí, Esmeraldas, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Orellana. Un total de 187 muestras fueron obtenidas. El análisis de un fragmento del gen 16S rRNA se realizó para ambos hemoparásitos. El análisis de *Borrelia* spp. se hizo mediante PCR convencional. Para *Mycoplasma* spp. se utilizó qPCR con SYBR GREEN, y la tecnología de secuenciamiento Oxford Nanopore para la identificación de especies. Los resultados de *Borrelia* spp. fueron negativos. En el Ecuador no hay reportes sobre dicha bacteria, a pesar de la amplia distribución de garrapatas en la zona. Mientras que, en *Mycoplasma* spp. hubo 9 muestras positivas en perros, identificadas por secuenciamiento como *Mycoplasma haemocanis*; también se incluyó una muestra de gato identificada como *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Ambas especies tienen una distribución mundial. La falta de información en Ecuador debe impulsar más este tipo de investigaciones, ya que el cambio climático y la deforestación afectan a la distribución de garrapatas y reservorios, pudiendo ser un problema de salud pública a largo plazo por el riesgo zoonótico demostrado en ellos.

Palabras clave: HEMOPARÁSITOS, VECTOR, RESERVORIO, PERROS, *Borrelia*, *Mycoplasma*

## Abstract

Hemoparasites can be transmitted by arthropod vectors and reservoirs and can cause mild or severe disease in individuals. The objective of the study was to detect and identify two hemoparasites in domestic dogs, *Borrelia* spp. and *Mycoplasma* spp. in blood samples from different rural areas of Ecuador. Samples were collected in Manabi, Esmeraldas, Pichincha, Santo Domingo de los Tsachilas and Orellana. A total of 187 samples were obtained. The analysis of a fragment of the 16S rRNA gene was performed for both hemoparasites. The analysis of *Borrelia* spp. was performed by conventional PCR. For *Mycoplasma* spp. was performed by qPCR with SYBR GREEN, and Oxford Nanopore sequencing technology was used for species identification. The results for *Borrelia* spp. were negative. There are no reports of this bacterium in Ecuador, despite the wide distribution of ticks in the area. Meanwhile, in *Mycoplasma* spp. there were 9 positive samples in dogs, identified by sequencing as *Mycoplasma haemocanis*; a cat sample identified as *Candidatus Mycoplasma haemominutum* was also included. Both species have a worldwide distribution. The lack of information in Ecuador should encourage this type of research, since the distribution of ticks and reservoirs is affected by climate change and deforestation and could become a public health problem in the long term due to the zoonotic risk that has been demonstrated in them.

Key words: HEMOPARASITES, VECTOR, RESERVOIR, DOGS, *Borrelia*, *Mycoplasma*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO I: ANTECEDENTES Y GENERALIDADES .....</b>	<b>10</b>
<b>Género <i>Borrelia</i> .....</b>	<b>11</b>
Biología.....	11
Clasificación de <i>Borrelia</i> spp.....	12
Aspectos generales de la enfermedad .....	13
<b>Género <i>Mycoplasma</i> .....</b>	<b>14</b>
Biología.....	14
Clasificación de <i>Mycoplasma</i> spp.....	15
Aspectos generales de enfermedad.....	16
<b>CAPÍTULO II: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>18</b>
Detección e identificación de <i>Borrelia</i> spp. y <i>Mycoplasma</i> spp. en perros domésticos de varias comunidades rurales del Ecuador .....	18
<b>METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>19</b>
LUGAR RECOLECCIÓN.....	19
MÉTODO DE RECOLECCIÓN.....	20
PRUEBAS MOLECULARES.....	20
EXTRACCIÓN DE ADN .....	20
Amplificación de un fragmento del gen $\beta$ actina .....	21
Amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA de <i>Borrelia</i> spp. ....	21
Amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA de <i>Mycoplasma</i> spp. ....	21
Identificación de <i>Mycoplasma</i> spp.....	21
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO A: SECUENCIAS DE LOS PRIMERS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO B: TOTAL DE MUESTRAS RECOLECTADAS DE CANINOS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO C: MELTING TEMPERATURES OF POSITIVE SAMPLES AMPLIFIED BY SYBR GREEN PCR FOR <i>Mycoplasma</i> spp. ....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO D: FILOGENIA DE ESPECIES DE <i>Mycoplasma</i> spp .....</b>	<b>48</b>

## **CAPÍTULO I: ANTECEDENTES Y GENERALIDADES**

Los parásitos sanguíneos o hemoparásitos constituyen un grupo de organismos patógenos que incluyen bacterias y eucariotas; se transmiten a los seres humanos y animales a través de vectores artrópodos, y horizontalmente por individuos infectados y reservorios. Su presencia produce alteraciones sanguíneas importantes y otras afecciones sistémicas. La enfermedad causada por estos agentes tiene importantes consecuencias para la salud pública, como altas tasas de mortalidad y discapacidad, pérdidas económicas tanto en humanos como animales, así como impacto sobre poblaciones de animales de vida silvestre (Robinson et al., 2015; Rodríguez et al., 2019).

La propagación de hemoparásitos transmitidos por artrópodos está relacionada con su distribución geográfica, la cual está directamente influenciada por factores ambientales que incluyen cambios de temperatura y precipitaciones; además, el hábitat, la ecología del hospedero y la intervención humana también son considerados factores de riesgo. Todos estos aumentan o disminuyen su ritmo de propagación (Robinson et al., 2015).

Los hemoparásitos que dependen de vectores para su transmisión logran adaptarse tanto a la biología del hospedador (vertebrado o invertebrado), lo que involucra complejos sistemas en el ciclo de vida para lograr mantenerse. Por ejemplo, las garrapatas encuentran grandes oportunidades de alimentación en diferentes mamíferos, desempeñando un papel importante en la biología de agentes infecciosos (Mlera & Bloom, 2018).

Los hospedadores vertebrados accidentales pueden funcionar como reservorios de varios hemoparásitos, lo que los convierte en protagonistas importantes en su transmisión (Mlera & Bloom, 2018). Los reservorios son considerados como sistemas ecológicos, en los cuales un agente infeccioso sobrevive indefinidamente (Ashford, 2003). Adicionalmente, juegan un papel importante al hospedar hemoparásitos y transmitirlos entre animales (epizootias) y hacia humanos (zoonosis) (Uribe et al., 2017). La asociación reservorio-hospedador puede actuar como potenciador en la diversificación de las especies y la distribución espacial de poblaciones (Margos et al., 2019).

Existe una gran diversidad de hemoparásitos, entre ellos están especies de *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., *Leishmania* spp., entre otros (Rodríguez et al., 2000). A continuación, se describe la biología y ciclo de transmisión de dos géneros de hemoparásitos bacterianos que producen enfermedad en perros: *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp.

## **Género *Borrelia***

### **Biología**

*Borrelia* es un género de bacteria gramnegativa, pertenecen al orden de los *Spirochaetales* por su forma helicoidal y motilidad (Barbour & Hayes, 1986). Una membrana externa rodea al cilindro protoplásmico conformado por el citoplasma, membrana celular interna y peptidoglicano. Consta de varios flagelos que rodean al cilindro de la bacteria, son lo bastante largos para superponerse de un extremo al otro, estos varían en longitud (8 a 30µm) diámetro y tensión (Charon et al., 2009). Las especies de *Borrelia* tienen capacidad para

evadir al sistema inmune, por la variable antigénica que se produce gracias al gen VlsE, la cual interviene en el cambio de epítotope, principalmente en borrelias causantes de enfermedad de Lyme (Smith et al., 2014). Otra característica distintiva es la estrecha relación que tiene entre parásito-vector, por ejemplo, *Ornithodoros hermsii* transmite *B. hermsii*, y no tiene la capacidad de transmitir otra *Borrelia* spp. (Cutler et al., 2008; El-Bahnsawy et al., 2012).

### **Clasificación de *Borrelia* spp.**

El género *Borrelia* se ha dividido en dos grandes grupos: los agentes causantes de enfermedad de Lyme y los agentes causantes de fiebre recurrente (Adeolu & Gupta, 2014). De acuerdo al tipo de enfermedad que causa el artrópodo involucrado y la especie a la que afecta, se las ha agrupado en:

- a. **Transmitidas por garrapatas duras (Familia: *Ixodidae*)**, causante de enfermedad de Lyme (LD – siglas en inglés). Pertenecen a este grupo el complejo de *B. burgdorferi* sensu lato (Nakao et al., 2021).
- b. **Transmitidas por garrapatas blandas (Familia: *Argasidae*)**, causantes de fiebre recurrente (STRF –siglas en inglés). Pertenecen a este grupo *B. hermsii* y *B. hispanica*, por ejemplo (El-Bahnsawy et al., 2012).
- c. **Transmitidas por garrapatas duras (Familia: *Ixodidae*)**, causante de fiebre recurrente (HTRF – siglas en inglés). Pertenecen a este grupo *B. theileri* y *B. miyamotoi*, por ejemplo (El-Bahnsawy et al., 2012).
- d. **Transmitida por piojos (*Pediculus humanus*)**, causante de fiebre recurrente (LBRF – siglas en inglés). *B. recurrentis*, es la única especie identificada (Schwan, 1996).

- e. **Transmitidas a reptiles, equidna y probablemente aves** (REP – siglas en inglés)  
(Lopez et al., 2010; Nakao et al., 2021).

### ***Aspectos generales de la enfermedad***

En la enfermedad de Lyme una manifestación típica es el eritema migrans, se observa artritis, radiculitis, meningitis, problemas cardiacos. Debido a que ninguna de estas manifestaciones es específica de la enfermedad se requieren pruebas diagnósticas para determinar el agente causal. Se suele utilizar serología para búsqueda de anticuerpos (Portillo et al., 2014).

En el caso de la fiebre recurrente se caracteriza por la fiebre súbita, dolor de cabeza, sudoración, escalofríos, dolor muscular y articular, decaimiento y debilidad. Podría haber otras manifestaciones en piel como petequias, ictericia tos y epistaxis. Debido a su sintomatología generalizada se podría confundir con cualquier enfermedad febril. El diagnóstico se realiza a través de frotis sanguíneo con tinción Giemsa o Wright, visualización de espiroquetas en campo oscuro o microscopio en frotis de sangre periférica. También existen antígenos específicos para el diagnóstico serológico y PCR (Sotelo & Valencia, 2012; Cutler, 2015).

El estudio del género *Borrelia* en perros ha adquirido mayor relevancia, ya que son considerados como centinelas del complejo *B. burgdorferi* sensu lato (Margos et al., 2020), y un indicador epidemiológico sobre nuevos brotes en personas (Solís et al., 2018). En Estados Unidos se han reportado casos de perros con fiebre recurrente causada por *B. turicatae*, el

diagnóstico fue realizado mediante PCR, ya que en algunos casos hubo falsos positivos en pruebas serológicas para anticuerpos contra *B. burgdorferi* (Piccione et al., 2016).

*Borrelia* spp. se encuentra entre los parásitos bacterianos más extendidos transmitidos por vectores (Barbour, 2005). Cabe recalcar que la especificidad del patógeno con el artrópodo no es igual a nivel de vertebrados, pudiendo encontrarse la misma especie de bacteria en diferentes animales reservorios. A pesar de ello, hay pocos estudios realizados en América Latina, lo que ha influido en el conocimiento de las enfermedades causadas por *Borrelia* spp. De esto se deriva la importancia de continuar con esfuerzos para afrontar esta problemática, pues la variedad de especies de garrapatas en la región crea un ambiente propicio para la transmisión y desarrollo de enfermedades (Schwan et al., 2002).

## **Género *Mycoplasma***

### **Biología**

El género *Mycoplasma* pertenece a la clase *Mollicutes*, poseen características muy distintivas de otras bacterias, como carecer de pared celular, son los organismos autoreplicantes más pequeños, su genoma puede ser de 0,58 mb (*M. genitalium*) a 1 mb (*M. pneumoniae*) en comparación con 4639 mb de *Escherichia coli* (Pollack et al., 1997). La membrana de los micoplasmas está compuesta por colesterol, el cual adquieren del ambiente en donde se establecen, ya que carecen de los genes que permiten su biosíntesis; lo utilizan también para funciones de crecimiento (Ramires & Higuchi, 2002).

La membrana celular tiene compuestos proteicos, lipoproteína, glicolípidos y lipoglucanos (Sirand-Pugnet et al., 2007), que constituyen un papel esencial en la hidrofobia de la membrana (Razin et al., 1998). Contienen lo esencial para la replicación: membrana plasmática, ribosomas y un cromosoma (Shmuel, 1996; Tasker et al., 2003). El genoma de *Mycoplasma* spp., debido a su naturaleza parasítica, posee un número significativo de genes para adhesinas y antígenos variables para evasión del sistema inmune (Razin & Hayflick, 2010).

Los micoplasmas evolucionaron a partir de bacterias grampositivas y se encuentran más filogenéticamente relacionados con los clostridios, específicamente *Clostridium innocuum* y *C. ramosum* (Krass & Gardner, 1973; Woese et al., 1980).

#### **Clasificación de *Mycoplasma* spp.**

La clasificación de *Mycoplasma* spp. esta dada por su filogenia, se divide en 5 grupos (Peters et al., 2008):

- a. **Grupo Spiroplasma**, está estrechamente relacionado con el género *Spiroplasma* perteneciente al orden *Mollicutes*. Pertenecen a este grupo las bacterias *M. capriculum* y *M. mycoides* (CABI, 2019).
- b. **Grupo Hominis**, este grupo está relacionado con infecciones causadas en humanos (*M. hominis*), aunque gracias a la filogenia se han sumado otros micoplasmas que afectan a animales como *M. bovis* (Peters et al., 2008).
- c. **Grupo Pneumonie**, pertenecen a este grupo *M. pneumonie*, está estrechamente relacionado con *M. genitalium*. Ambos causan infecciones principalmente en humanos inmunocomprometidos (Rufo et al., 2021).

- d. **Grupo Hemoplasma**, pertenecen a este grupo los micoplasmas hemotrópicos, cuya característica es el tropismo por los eritrocitos y pueden ser causantes de anemia hemolítica. Su patogenicidad puede variar dependiendo de la especie. Se divide en dos subgrupos: *Haemoplasma* y *Haemoparvatum* (Rufo et al., 2021). La presente investigación de hemoparásitos está basada en este grupo.

### ***Aspectos generales de enfermedad***

Los hemoplasmas pueden causar anemia infecciosa en varias especies de mamíferos, incluyendo animales de compañía como perros y gatos, el diagnóstico se da principalmente por frotis sanguíneo y el uso de PCR para confirmación (Willi et al., 2009). Aunque es raro, se ha comprobado su potencial zoonótico, por ejemplo, *M. haemofelis*, fue aislado a partir de sangre entera de una paciente diagnosticada con VIH, quién durante la convivencia diaria recibía mordeduras y arañazos de sus gatos (Pires dos Santos et al., 2008). Los micoplasmas hemotrópicos han coevolucionado con sus hospederos específicos propiciando mecanismos especializados de adaptación, además su distribución es cosmopolita (Chen et al., 2022; Dawood et al., 2022).

En caninos, se han aislado principalmente *M. haemocanis* y *Candidatus M. haematoparvum*, causantes de anemia en animales inmunocomprometidos. Esta especie ha sido documentada alrededor del mundo en Europa, Reino Unido y Norteamérica (Chalker, 2005; Huggins et al., 2023). En los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de hemoplasmas en caninos, no es común su búsqueda como causa de infección. La falta de conocimiento podría ser uno de los factores que contribuyan con este hecho (Chalker, 2005).

Se ha asociado su presencia en animales en hacinamiento como perreras y animales mayores, aunque se pueden encontrar clínicamente sanos (Novacco et al., 2010). Los hemoplasmas son muy diversos y la identificación de sus especies supone un desafío a las herramientas moleculares (Willi et al., 2009).

## CAPÍTULO II: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

### ***Detección e identificación de Borrelia spp. y Mycoplasma spp. en perros domésticos de varias comunidades rurales del Ecuador***

El concepto de “One Health” es un modelo interdisciplinario que depende de la colaboración múltiple a nivel local, nacional y global para lograr una salud óptima para los seres humanos, los animales y el medio ambiente. Los hemoparásitos en este sentido juegan un papel importante, al estar vinculados con este modelo (Hong et al., 2023). Los procesos ecoepidemiológicos permiten entrever la complejidad de las interacciones entre vectores, reservorios y medio ambiente. Ya que los hemoparásitos desarrollan mecanismos que les permiten adaptarse a su hospedador invertebrado (artrópodo) y vertebrado, al mismo tiempo dependen del hábitat donde se desarrollan para poder continuar con su ciclo biológico (Mlera & Bloom, 2018).

Alrededor del mundo los hallazgos en diferentes estudios sobre hemoparásitos en perros revelan nueva información sobre la epidemiología de patógenos transmitidos a través de vectores y/o reservorios, estos serán útiles para el desarrollo de medidas eficientes que permitan salvaguardar la salud y el bienestar de los animales de compañía y sus propietarios (Yin et al., 2023). A pesar de estos descubrimientos los esfuerzos por continuar con estudios deben seguir, por ejemplo, los vectores artrópodos de *Borrelia* spp. están bien documentados en otros países a nivel mundial, sin embargo, en el Ecuador ese no es el caso, aunque se ha comenzado a construir una base de conocimiento para guiar la búsqueda. No sucede lo mismo con *Mycoplasma* spp. cuyos vectores y reservorios no han sido del todo establecidos, habiendo solo indicios de posibles agentes involucrados como *Rhipicephalus sanguineus*, la

garrapata marrón del perro y posibles reservorios en perros clínicamente sanos, roedores y murciélagos (Novacco et al., 2010). Influye también en la dinámica de este tipo de estudios, los hemoparásitos como agentes de enfermedades emergentes, ya que la distribución de los vectores se ve afectada por los cambios climáticos favoreciendo su expansión hacia nuevos nichos ecológicos (Zannou et al., 2021).

El estudio de vectores y reservorios de enfermedades hemoparasitarias en el Ecuador puede llevar a un mejor conocimiento de la dinámica de las mismas. La falta de investigación siempre será una ventana abierta hacia la incertidumbre epidemiológica, lo cual puede acarrear con el tiempo problemas de salud pública que pueden ser evitables. El objetivo del presente estudio fue investigar la presencia de *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp., en sangre entera de perros domésticos recolectada en varias zonas rurales del país. Este estudio resulta relevante, debido a la poca información publicada sobre hemoparásitos en perros en el Ecuador. Este podrá servir como línea base de investigación para determinar la prevalencia de estas enfermedades y sus interacciones con los actores involucrados.

## ***METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN***

### **LUGAR RECOLECCIÓN**

Para la realización de este estudio se tomaron muestras en diferentes localidades rurales de varias provincias del Ecuador: Mindo en Pichincha, Parque Nacional Yasuní en Orellana, Rocafuerte en Manabí, Las Peñas en Esmeraldas, Cristo Vive en Santo Domingo y una comunidad Kichwa ubicada en la ribera del Río Napo. Adicionalmente, se analizaron muestras positivas al test SNAP 4Dx Plus® para enfermedad de Lyme. Estas últimas se

colectaron en la ciudad de Quito, y se entregaron para su investigación gracias a la colaboración de la Dra. Gabriela Chávez, directora médica de LabVet Quito, cuyo laboratorio se encarga del diagnóstico veterinario a nivel privado. Todas las muestras fueron colectadas gracias a la colaboración de varios proyectos dirigidos por el Dr. Eduardo Díaz, Dra. Verónica Barragán y Dr. Patricio Rojas, investigadores de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Los animales muestreados fueron principalmente perros, sin embargo, también se logró obtener muestras de gatos en Santo Domingo; bovinos en Manabí y Quinindé pertenecientes a Esmeraldas; y una muestra de sangre de un ratón en Rocafuerte (Anexo B).

## **MÉTODO DE RECOLECCIÓN**

El protocolo de recolección de muestras fue realizado bajo el permiso otorgado por el CEDIA – USFQ. Las muestras de sangre entera fueron tomadas mediante punción venosa cefálica o yugular en perros y gatos, y de la vena coccígea en bovinos. Previamente se hizo sujeción de los animales y se procedió a limpiar el área para tomar la muestra en tubos con anticoagulante EDTA, para conservar la sangre entera y realizar la extracción. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta ser transportadas al IM, donde se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

## **PRUEBAS MOLECULARES**

### **EXTRACCIÓN DE ADN**

Las muestras se descongelaron y el ADN fue extraído con el kit comercial PureLink® Genomic DNA de Invitrogen. Una vez extraído el material genético se almacenó a -20°C.

### **Amplificación de un fragmento del gen $\beta$ actina**

Previo la estandarización de la PCR de *Borrelia* spp., y *Mycoplasma* spp., se realizó la amplificación de un fragmento del gen  $\beta$  actina, en el 10% de las muestras extraídas con el fin de comprobar posibles inhibiciones por exceso o falta de ADN, o residuos de compuestos como etanol, por ejemplo. El protocolo fue tomado de Hopwood et al (1999), se utilizó la polimerasa GoTaq®. El fragmento de la secuencia fue de 390 pb.

### **Amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA de *Borrelia* spp.**

Los primers utilizados para la amplificación están basados en el estudio de Lee et al. (2019), el tamaño del amplicón es de 354 pb. También, se realizó un alineamiento del gen 16S rRNA de todas las especies de *Borrelia* spp. encontradas en el NCBI, para determinar si era posible amplificar todas las especies transmitidas por garrapatas, y su capacidad para discriminar entre especies. El protocolo se basó en las condiciones propuestas en el inserto Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, 2008). El control positivo fue gentilmente proveído por el Dr. Nate Nieto, contenía ADN de *B. burgdorferi*. Los amplicones fueron utilizados en todos los ensayos como control positivo.

### **Amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA de *Mycoplasma* spp.**

La detección de *Mycoplasma* spp. fue realizada mediante qPCR, utilizando el reactivo SYBR®Green, el protocolo se basó en el estudio de Willi et al (2009). Para el control positivo se utilizó una vacuna de *M. gallinarum*.

### **Identificación de *Mycoplasma* spp.**

Para la secuenciación se tomaron los amplicones de las muestras positivas. El proceso de secuenciamiento se realizó mediante la tecnología Oxford Nanopore. El kit utilizado fue

Ligation Sequencing SQK-LSK109, las muestras se cargaron en una MinION Flowcell FLO-MIN106. Todos los pasos se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante, excepto el primer paso de purificación, ya que la muestra contenía poco volumen en el tubo (<10ul), por esta razón, este se realizó posteriormente. Para obtener los resultados, las lecturas de las secuencias tardaron 24 horas en realizarse.

Las secuencias fueron demultiplexeadas usando el software Guppy y Porechop. Los documentos FastQ se analizaron con el protocolo Amplicon Sorter, siguiendo el método descrito por Vierstraete & Braeckman (2022), y generando una secuencia consenso en base a similitud y tamaño. La construcción del árbol se hizo con el programa Mega, donde el modelo de Kimura fue la base para el análisis.

## **RESULTADOS**

Fueron obtenidas un total de 187 muestras sanguíneas de caninos de todas las localidades: Parque Nacional Yasuní (n=44), ribera del Río Napo (n=52), Las Peñas (n=7), Mindo (n=22), Rocafuerte (n=32), Santo Domingo (n=22) y Quito (LabVet) (n=3). Se lograron obtener también muestras de bovinos en Rocafuerte (n=7) y Quinindé (n=25), y se muestreó sangre del corazón de un ratón en Manabí. El análisis molecular de *Mycoplasma* spp. y *Borrelia* spp. se hizo en todos los perros, gatos y el ratón. Y en bovinos únicamente de *Borrelia* spp.

Los resultados del análisis de *Borrelia* spp. fueron negativos en todas las muestras. En tanto que, la presencia de *Mycoplasma* spp. en perros con qPCR fue de 8.55 % (n=16/187) en

caninos, de las cuales 12.5 % (n=2/16) pertenecen a Yasuní, 43.75 % (n=7/16) a Rocafuerte, el 18.75 % (n=3/16) a Las Peñas y el 25 % (n=4/16) a Mindo. También se obtuvo una muestra positiva de gato (33.3 %; n=1/3) obtenida en Santo Domingo.

Después de obtener las muestras positivas, se hizo nuevamente una qPCR, para obtener los amplicones que se usaron para la secuenciación. De las 17 muestras positivas a *Mycoplasma* spp, 10 dieron como resultado 3 especies identificadas como: *M. haemofelis*, *M. haemocanis* y *Candidatus M. haemominutum*, esta última en la muestra de gato (ANEXO C). El temperatura de Melting en las muestras de perros fue de 73.5 °C, y en la muestra de gato de 72.5 °C.

La filogenia reveló que los caninos P29, G79, G53, Sim, G78 y P33, se agrupan con secuencias de *M. haemofelis*. La especie *M. haemocanis* es más cercana a la muestra Kae, G48 y G49, sin embargo, también se agrupa como un ancestro de varias secuencias de *M. haemofelis*. Se observa que, la muestra de gato se agrupa con *Candidatus M. haemominutum*. Se utilizó a *C. innocuum* como outgroup (Tasker et al., 2003; Mongruel et al., 2022).

## **DISCUSIÓN**

La presencia de parásitos sanguíneos en perros domésticos es un tema poco conocido en el Ecuador, aunque en la clínica veterinaria se encuentran frecuentemente, estos datos no son validados por un ente regulador, por lo tanto, no son oficiales. Métodos como el frotis

sanguíneo y test rápidos para detección de anticuerpos, son empleados con frecuencia por los médicos veterinarios para el diagnóstico de varios hemoparásitos.

En cuanto a *Borrelia* spp. se esperaba poder amplificar el fragmento del gen 16S rRNA al menos en 3 muestras seropositivas al test SNAP 4Dx<sup>®</sup>, que detecta anticuerpos contra *B.burgdorferi*. El fabricante del test indica que en 0,027% de muestras puede reaccionar en todos los puntos del test debido a sustancias interferentes en la sangre del paciente (IDEXX, s. f.). No se menciona la posibilidad de reacciones cruzadas con otros patógenos analizados en el mismo. En el Ecuador se han realizado varias investigaciones con el test SNAP 4Dx<sup>®</sup>, en las ciudades de Portoviejo, Manta y Guayaquil con resultados negativos (McCown et al., 2014; Rivadeneira et al., 2021). De igual manera en Colombia, se encontraron dos investigaciones con resultados similares (McCown et al., 2014; Bonilla-Aldana et al., 2022). Lo anterior indica ausencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, así lo corroboran los autores Liu et al (2018), afirmando que la sensibilidad y la especificidad para la detección de *B. burgdorferi*, con el test es mayor al 95% (IDEXX, 2022).

Esta especie se aísla con mayor probabilidad en sitios de mordida de la garrapata, por tal motivo, se ha analizado la sensibilidad del PCR en muestras de tejido cercanas a la picadura en perros con resultados positivos para la detección del ADN (Straubinger, 2000; Hyde, 2017; Nakao et al., 2021). A nivel regional solo se encontró un estudio en Colombia con metodología de PCR, para la búsqueda de *Borrelia* spp. en murciélagos, encontrándose una cepa cercana filogenéticamente a *B. burgdorferi* (Muñoz et al., 2021). El género *Ixodes* es el principal vector de *B. burgdorferi* sensu lato, la especie *I. boliviensis*, fue reportada en un estudio sobre

hemoparásitos en tapires (Pesquera et al 2015). Los registros del género *Ixodes* son pocos en América del Sur, y se cree que su influencia en la transmisión de enfermedades es baja en comparación con otras partes del mundo (Guglielmone et al., 2006).

Por otro lado, la presencia de borrelias causantes de fiebre recurrente podría estar subestimada en América Latina, debido a la presencia de otras enfermedades febriles como malaria y dengue en humanos (Faccini et al., 2018). Se ha descrito la infección en perros en varios países como España, Estados Unidos, Israel e Irán (Kelly et al., 2014; Baneth et al., 2016; Shirani et al., 2016; Margos et al., 2020). También, hay información de *B. theileri* transmitida por *Rhipicephalus microplus* en América del Sur (Faccini et al., 2022). Faccini et al., (2022) la catalogan como una enfermedad olvidada, porque su interés se perdió a mediados del siglo XX. Debido a esto, el diagnóstico serológico no se ha producido masivamente por la poca demanda comercial (Cutler, 2015). Hay evidencia de reacción cruzada de anticuerpos de *B. turicatae* frente a *B. burgdorferi* sensu lato, en perros, lo que podría significar el subdiagnóstico de la bacteria (Gettings et al., 2019). En humanos, se ha descubierto como el desarrollo de pruebas serológicas dirigidas a la proteína GlpQ, en sueros de pacientes positivos a Lyme, eran reactivas a dichas pruebas (Schwan et al., 1996).

Las borrelias causantes de fiebre recurrente causan alta espiroquetemia en individuos infectados (Dietrich et al., 2021). Varios autores han realizado diferentes ensayos de PCR y qPCR (Modarelli et al., 2019; Breuer et al., 2021), es de vital importancia la continuación de este tipo de detección de borrelias, ya que la ausencia de resultados en la PCR no asegura que

no haya presencia en los sitios de recolección. El cambio climático influye favorablemente en la expansión de garrapatas hacia nichos donde antes no se encontraban (Guillemi et al., 2015).

Con relación a los resultados positivos de *M. haemocanis* y *M. haemofelis* en perros, y *Candidatus M. haemominutum* en gatos se encontró un estudio en la provincia de Galápagos, en la Isla Isabela, con la presencia de *M. haemocanis* en 1 de 95 perros y *M. haemofelis* en 1 de 52 gatos (Levy et al., 2008). En Europa hay varios estudios realizados, por ejemplo, en Italia, hay prevalencia del patógeno en perros del 4.7 % (13/278) para *M. haemocanis*. La prevalencia en gatos para *Candidatus M. haemominutum* fue de 12.3 % (28/227). Los factores de riesgo como edad avanzada, el sexo y el virus de inmunodeficiencia felina predisponen a la infección en gatos (Ravagnan et al., 2017).

La diferencia entre las dos primeras no se puede determinar, con un fragmento pequeño del gen 16S rRNA (132 pb), el secuenciamiento del gen completo no es suficiente para la diferenciación entre especies (Willi et al., 2009; Messick et al., 2002). El análisis de cada gen entre ambas especies revela sintenia conservada, y alta similitud en composición y arquitectura, su diferencia se encuentra en pequeñas secuencias que codifican proteínas únicas. La identidad promedio de nucleótidos (ANI) y la firma de tetranucleótidos determinan la diferencia entre ambos patógenos, de modo que *M. haemocanis* y *M. haemofelis* infectan a perros y gatos respectivamente (do Nascimento et al., 2012).

Tanto reservorios y vectores de *M. haemofelis* y *M. haemocanis*, no han sido identificados en su totalidad (Ikeda et al., 2022). *Candidatus M. haemominutum* se encuentra

en saliva y heces de gatos infectados en fases tempranas, en cambio, en *M. haemofelis* la pulga podría ser un vector (Willi et al., 2007). Un estudio realizado en roedores salvajes en Israel documentó como estos podrían ser reservorios de *M. haemurris* por largos períodos (>800 días) (Cohen et al., 2018). En Camboya, se realizó un estudio eliminando en los perros todos los parásitos externos, se comprobó que a través de mordeduras probablemente hubo mayor transmisión de *M. haemocanis* entre los individuos (Huggins et al., 2023).

En América Latina, la información sobre micoplasma hemotrópico es insuficiente. Hay estudios realizados en murciélagos, que podrían actuar como reservorios (Luna et al., 2023). En Brasil, se ha encontrado una alta diversidad genética entre las secuencias de 16S rRNA en *Mycoplasma* spp. detectadas en murciélagos no hematófagos identificadas en otras regiones del mundo (Ikeda et al., 2022). En Perú y Belice, un estudio en saliva de murciélagos vampiro detectó varios hemoplasmas ya conocidos y algunos candidatos nuevos, ya que se alimentan de sangre de humanos, animales domésticos y vida silvestre, se debería investigar su potencial como reservorios y agentes transmisores entre especies (Volkhov et al., 2017).

La escasez de estudios sobre hemoparásitos se evidencia con pocas publicaciones sobre el tema en general a nivel de la Amazonía, el Ecuador y países vecinos así lo mencionan Diaz et al., (2021), cuya revisión lo demuestra. Además, se desconoce los vectores y su capacidad zoonótica. Es desconocido el impacto que podría causar en la salud humana y animal. Los riesgos potenciales de transmisión zoonótica deben ser evaluados, por ello es importante seguir avanzando en investigaciones que permitan identificar riesgos para la población humana y animal.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados de la búsqueda de *Borrelia* spp. en muestras de caninos de diferentes localidades dio resultados negativos, aunque se obtuvieron 3 muestras de LabVet, positivas según la prueba SNAP 4Dx a anticuerpos contra *B. burgdorferi*. Se concluyó que pueden ser reacciones cruzadas o falsos positivos por la presencia de sustancias en la sangre de los caninos que dificultan la ejecución de la prueba.

La detección de *Mycoplasma* spp. dio como resultado la identificación de 2 especies: *M. haemocanis* y *M. haemominutum* en perros y gatos respectivamente. En todas las localidades donde se investigó *Mycoplasma* spp. se encontró presencia de la bacteria. Esto confirma la circulación del patógeno en las zonas tropicales del país, así como se ha observado en el resto del mundo. Además, hubo 7 muestras de Las Peñas, de las cuales dos fueron positivas y secuenciadas, siendo esta la localidad con mayor positividad respecto de la cantidad de muestras, por lo cual, es interesante realizar mayor cantidad de estudios en estas localidades y comprender la dinámica del patógeno.

El estudio se hizo en diferentes parroquias rurales del Ecuador gracias a la colaboración de varios proyectos interinstitucionales. Lo cual impidió el establecimiento de una cantidad de animales estadísticamente significativa para una población infinita, por ello los cálculos de prevalencia no se pueden realizar.

Una de las limitaciones del estudio es el temperamento de los animales muestreados, puesto que los más dóciles son más fáciles de muestrear, la idiosincrasia de las personas en zonas rurales los mantiene generalmente alejados del contacto cercano con los perros.

El hecho de que hay bacterias como *B. burgdorferi* que no se encuentran en la sangre después de varios días de presencia de la enfermedad podría limitar su búsqueda a través de PCR en sangre. Por lo que es ideal implementar en estudios que impliquen hemoparásitos, la investigación de sus posibles vectores. En este caso específico, se debería coleccionar garrapatas de los animales muestreados realizar un pool y correlacionar los resultados de ambas pruebas.

La revisión de literatura se limitó a fuentes extranjeras, ya que en Ecuador no hay estudios desarrollados que puedan ser comparables. Lo cual puede inferir en la información proporcionada la que dependiendo de la región la transmisión, los vectores y su presentación varía. Además, algunos archivos como tesis no se pudieron incluir en la discusión. La información que se encontró en el país no era actual y algunos estudios encontrados se realizaron en animales no domésticos.

Este tipo de investigaciones son importantes debido a la cercanía que tiene el ser humano con los animales domésticos, quienes siempre pueden ser reservorio de agentes infecciosos y viceversa. Existe un riesgo de salud pública que no se ha explorado, y que debe ser tomado en cuenta para planes de prevención. Es por ello la importancia de estos estudios, que dan pauta para comprender el comportamiento de un agente infeccioso causante de enfermedad, y a futuro pueda ser la base de nuevas investigaciones, con datos comparables.

Los resultados negativos de *Borrelia* spp., no confirman la ausencia de la bacteria en el país, se necesita implementar nuevos modelos de estudio enfocados a descartar su presencia en el Ecuador. En cuanto a *Mycoplasma* spp. su distribución cosmopolita, implica un hallazgo usual en el país dentro de los laboratorios veterinarios de diagnóstico. Sin embargo, la distinción entre especies de *Mycoplasma* puede ayudar a los individuos a recibir mejores tratamientos. De igual forma con hallazgos como los detallados en Brasil, donde una persona con VIH contrajo *M. haemofelis* a partir de uno de sus gatos, da la pauta para poder implementar estudios tanto en personas como en animales para caminar poco a poco hacia el concepto de “One health”.

## **REFERENCIAS**

- Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: The emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 1049-1072. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0164-x>
- Ashford, R. W. (2003). *When Is a Reservoir Not a Reservoir?* -. 9(11). <https://doi.org/10.3201/eid0911.030088>
- Baneth, G., Nachum-Biala, Y., Halperin, T., Hershko, Y., Kleinerman, G., Anug, Y., Abdeen, Z., Lavy, E., Aroch, I., & Straubinger, R. K. (2016). *Borrelia persica* infection in dogs and cats: Clinical manifestations, clinicopathological findings and genetic characterization. *Parasites & Vectors*, 9(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1530-5>
- Barbour, A. G. (2005). Relapsing Fever. En *Tick-Borne Diseases of Humans* (pp. 268-291). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555816490.ch16>
- Barbour, A. G., & Hayes, S. F. (1986). Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, 50(4), 381-400.
- Bonilla-Aldana, D. K., Gutiérrez-Grajales, E. J., Martínez-Arboleda, J. P., Reina-Mora, M. A., Trejos-Mendoza, A. E., Pérez-Vargas, S., Valencia-Mejía, L., Marín-Arboleda, L. F., Osorio-Navia, D., Chacón-Peña, M., González-Colonia, L. V., Cardona-Ospina, J. A., Jiménez-Posada, E. V., Díaz, A., Salazar, J. C., Sierra, M., Muñoz-Lara, F., Zambrano, L. I., Ramírez-Vallejo, E., ... Rodríguez-Morales, A. J. (2022). Seroprevalence canine survey for selected vector-borne pathogens and its relationship with poverty in metropolitan

- Pereira, Colombia, 2020. *Parasite Epidemiology and Control*, 17, e00249.  
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00249>
- Breuer, A., Megged, O., Kashat, L., & Assous, M. V. (2021). Quantitative real-time PCR in *Borrelia persica* tick-borne relapsing fever demonstrates correlation with the Jarisch-Herxheimer reaction. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(5), 1113-1116. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04148-4>
- CABI. (2019). *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae*. *CABI Compendium*, *CABI Compendium*, 74545. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.74545>
- Chalker, V. J. (2005). Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79(1), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.10.002>
- Charon, N. W., Goldstein, S. F., Marko, M., Hsieh, C., Gebhardt, L. L., Motaleb, M. A., Wolgemuth, C. W., Limberger, R. J., & Nancy. (2009). The Flat-Ribbon Configuration of the Periplasmic Flagella of *Borrelia burgdorferi* and Its Relationship to Motility and Morphology. *Journal of Bacteriology*, 191(2), 600-607.  
<https://doi.org/10.1128/jb.01288-08>
- Chen, R., Zhao, L., Gan, R., Feng, Z., Cui, C., Xie, X., Hao, F., Zhang, Z., Wang, L., Ran, T., Wang, W., Zhang, S., Li, Y., Zhang, W., Pang, M., Xiong, Q., & Shao, G. (2022). Evidence for the Rapid and Divergent Evolution of Mycoplasmas: Structural and Phylogenetic Analysis of Enolases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.811106>
- Cohen, C., Shemesh, M., Garrido, M., Messika, I., Einav, M., Khokhlova, I., Tasker, S., & Hawlena, H. (2018). Haemoplasmas in wild rodents: Routes of transmission and

- infection dynamics. *Molecular Ecology*, 27(18), 3714-3726.  
<https://doi.org/10.1111/mec.14826>
- Corrales, L. C., Quijano Duarte, S., & Ramírez Hernández, E. (2022). Detección de anticuerpos tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, y factores asociados a la enfermedad de Lyme en población canina, de los municipios Honda-Tolima, La Mesa y Chia-Cundinamarca. *Nova*, 20(38), 11-35. <https://doi.org/10.22490/24629448.6180>
- Cutler, S. J. (2015). Relapsing Fever *Borreliae*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(4), 847-865.  
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.07.001>
- Cutler, S. J., Scott, J. C., & Wright, D. J. M. (2008). Phylogenetic origins of *Borrelia recurrentis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 193-202.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.11.011>
- Dawood, A., Algharib, S. A., Zhao, G., Zhu, T., Qi, M., Delai, K., Hao, Z., Marawan, M. A., Shirani, I., & Guo, A. (2022). Mycoplasmas as Host Pantropic and Specific Pathogens: Clinical Implications, Gene Transfer, Virulence Factors, and Future Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.855731>
- Diaz, E., Hidalgo, A., Villamarin, C., Donoso, G., & Barragan, V. (2021). Vector-borne zoonotic blood parasites in wildlife from Ecuador: A report and systematic review. *Veterinary World*, 14(7), 1935-1945. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1935-1945>
- Dietrich, E. A., Replogle, A. J., Sheldon, S. W., & Petersen, J. M. (2021). Simultaneous Detection and Differentiation of Clinically Relevant Relapsing Fever *Borrelia* with Semimultiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(7), 10.1128/jcm.02981-20.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.02981-20>

- do Nascimento, N. C., Santos, A. P., Guimaraes, A. M., SanMiguel, P. J., & Messick, J. B. (2012). *Mycoplasma haemocanis* – the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary Research*, 43(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-66>
- El-Bahnsawy, M. M., Labib, N. A., Abdel-Fattah, M. A.-H., Ibrahim, A. M. A., & Morsy, T. A. (2012). Louse and tick borne relapsing fevers. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 42(3), 625-638.
- Faccini-Martínez, Á. A., González T, M., Mattar V, S., Faccini-Martínez, Á. A., González T, M., & Mattar V, S. (2018). Tick-borne relapsing fever: Another underdiagnosed etiology in tropical Latin America? *Revista MVZ Córdoba*, 23(1), 6399-6402. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1230>
- Faccini-Martínez, Á. A., Silva-Ramos, C. R., Santodomingo, A. M., Ramírez-Hernández, A., Costa, F. B., Labruna, M. B., & Muñoz-Leal, S. (2022). Historical overview and update on relapsing fever group *Borrelia* in Latin America. *Parasites & Vectors*, 15(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05289-5>
- Gettings, J. R., Lopez, J. E., Krishnavajhala, A., Armstrong, B. A., Thompson, A. T., & Yabsley, M. J. (2019). Antibodies to *Borrelia turicatae* in Experimentally Infected Dogs Cross-React with *Borrelia burgdorferi* Serologic Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(9), 10.1128/jcm.00628-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.00628-19>
- Guglielmone, A. A., Beati, L., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Nava, S., Venzal, J. M., Mangold, A. J., Szabó, M. P. J., Martins, J. R., González-Acuña, D., & Estrada-Peña, A. (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental & Applied Acarology*, 40(2), 83-100. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>

- Guillemi, E. C., Tomassone, L., & Farber, M. D. (2015). Tick-borne Rickettsiales: Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, *119*, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.009>
- Hong, Y., Kassegne, K., Okpeku, M., Zheng, B., & Chen, J.-H. (2023). Editorial: Control and prevention of tropical diseases by advanced tools and the One Health approach. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1289224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1289224>
- Hopwood, A. J., Fairbrother, K. S., Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Science*, *53*(4), 227-231. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00060-1)
- Huggins, L. G., Baydoun, Z., Mab, R., Khouri, Y., Schunack, B., Traub, R. J., & Colella, V. (2023). Transmission of haemotropic mycoplasma in the absence of arthropod vectors within a closed population of dogs on ectoparasiticides. *Scientific Reports*, *13*, 10143. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37079-z>
- Hyde, J. A. (2017). *Borrelia burgdorferi* Keeps Moving and Carries on: A Review of Borrelial Dissemination and Invasion. *Frontiers in Immunology*, *8*, 114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00114>
- IDEXX. (s. f.). *La prueba SNAP 4Dx Plus detecta 6 enfermedades transmitidas por vectores—IDEXX Spain* [Prueba SNAP 4Dx Plus]. IDEXX. Recuperado 2 de abril de 2022, de <https://www.idexx.es/es/veterinary/snap-tests/snap-4dx-plus-test/>
- IDEXX. (2022). *SNAP 4Dx Plus Test*. <https://www.idexx.com/files/snap-4dx-plus-test-accuracy.pdf>
- Ikeda, P., Torres, J. M., Lourenço, E. C., Albery, G. F., Herrera, H. M., de Oliveira, C. E., Machado, R. Z., & André, M. R. (2022). Molecular detection and genotype diversity of

- hemoplasmas in non-hematophagous bats and associated ectoparasites sampled in peri-urban areas from Brazil. *Acta Tropica*, 225, 106203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106203>
- Kelly, A. L., Raffel, S. J., Fischer, R. J., Bellinghausen, M., Stevenson, C., & Schwan, T. G. (2014). First isolation of the relapsing fever spirochete, *Borrelia hermsii*, from a domestic dog. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(2), 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.08.005>
- KRASS, C. J., & GARDNER, M. W. (1973). Etymology of the Term Mycoplasma. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(1), 62-64. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-1-62>
- Leeflang, M. M. G., Ang, C. W., Berkhout, J., Bijlmer, H. A., Van Bortel, W., Brandenburg, A. H., Van Burgel, N. D., Van Dam, A. P., Dessau, R. B., Fingerle, V., Hovius, J. W. R., Jaulhac, B., Meijer, B., Van Pelt, W., Schellekens, J. F. P., Spijker, R., Stelma, F. F., Stanek, G., Verduyn-Lunel, F., ... Sprong, H. (2016). The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 16, 140. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1468-4>
- Levy, J. k., Crawford, P. c., Lappin, M. r., Dubovi, E. j., Levy, M. g., Alleman, R., Tucker, S. j., & Clifford, E. I. (2008). Infectious Diseases of Dogs and Cats on Isabela Island, Galapagos. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 60-65. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.0034.x>
- Liu, J., Drexel, J., Andrews, B., Eberts, M., Breitschwerdt, E., & Chandrashekar, R. (2018). Comparative Evaluation of 2 In-Clinic Assays for Vector-Borne Disease Testing in Dogs.

*Topics in Companion Animal Medicine*, 33(4), 114-118.

<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2018.09.003>

Lopez, J. E., Schruppf, M. E., Nagarajan, V., Raffel, S. J., McCoy, B. N., & Schwan, T. G. (2010).

A novel surface antigen of relapsing fever spirochetes can discriminate between relapsing fever and Lyme borreliosis. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17(4), 564-571. <https://doi.org/10.1128/CVI.00518-09>

Lumb, W. (1961). *Canine haemobartonellosis and its feline counterpart*. 14, 24-25.

Luna, N., Muñoz, M., Castillo-Castañeda, A., Hernandez, C., Urbano, P., Shaban, M., Paniz-

Mondolfi, A., & Ramírez, J. D. (2023). Characterizing the blood microbiota of omnivorous and frugivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in Casanare, eastern Colombia. *PeerJ*, 11. <https://doi.org/10.7717/peerj.15169>

Margos, G., Fingerle, V., & Reynolds, S. (2019). *Borrelia bavariensis*: Vector Switch, Niche

Invasion, and Geographical Spread of a Tick-Borne Bacterial Parasite. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2019.00401>

Margos, G., Pantchev, N., Globokar, M., Lopez, J., Rodon, J., Hernandez, L., Herold, H., Salas,

N., Civit, A., & Fingerle, V. (2020). First Cases of Natural Infections with *Borrelia hispanica* in Two Dogs and a Cat from Europe. *Microorganisms*, 8(8), 1251. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081251>

McCown, M., & Monterroso, V. (2014). *Zoonotic And Infectious Disease Surveillance In*

*Ecuador: Ehrlichia Canis, Anaplasma Phagocytophilum, Borrelia Burgdorferi, And Dirofilaria Immitis Prevalence Rates In Canines.*

[https://www.jsomonline.org/jsomstorefront/index.php?rt=product/product&product\\_id=394](https://www.jsomonline.org/jsomstorefront/index.php?rt=product/product&product_id=394)

Mccown, M., Monterroso, V. H., & Cardona, W. (2014). Surveillance for Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, and Dirofilaria immitis in Dogs From Three Cities in Colombia. *Journal of Special Operations Medicine*, 14(1), 86.

<https://doi.org/10.55460/YYT5-90FP>

Messick, J. B., Walker, P. G., Raphael, W., Berent, L., & Shi, X. (2002). «Candidatus mycoplasma haemodidelphidis» sp. nov., «Candidatus mycoplasma haemolamae» sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (Didelphis virginiana), alpaca (Lama pacos) and dog (Canis familiaris): Phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 3), 693-698. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-693>

Mlera, L., & Bloom, M. E. (2018). The Role of Mammalian Reservoir Hosts in Tick-Borne Flavivirus Biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00298>

Modarelli, J. J., Piccione, J., Ferro, P. J., & Esteve-Gasent, M. D. (2019). Novel real-time PCR assays for genomic group identification of tick-borne relapsing fever species Borrelia hermsii. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(1), 24-29.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.001>

Mongruel, A. C. B., Medici, E. P., Canena, A. da C., Calchi, A. C., Machado, R. Z., & André, M. R. (2022). Expanding the Universe of Hemoplasmas: Multi-Locus Sequencing Reveals Putative Novel Hemoplasmas in Lowland Tapirs (Tapirus terrestris), the Largest Land

Mammals in Brazil. *Microorganisms*, 10(3), 614.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030614>

Muñoz-Leal, S., Faccini-Martínez, Á. A., Pérez-Torres, J., Chala-Quintero, S. M., Herrera-Sepúlveda, M. T., Cuervo, C., & Labruna, M. B. (2021). Novel *Borrelia* genotypes in bats from the Macaregua Cave, Colombia. *Zoonoses and Public Health*, 68(1), 12-18.  
<https://doi.org/10.1111/zph.12789>

Nakao, R., Kasama, K., Boldbaatar, B., Ogura, Y., Kawabata, H., Toyoda, A., Hayashi, T., Takano, A., & Maeda, K. (2021). The evolution of hard tick-borne relapsing fever borreliae is correlated with vector species rather than geographical distance. *BMC Ecology and Evolution*, 21, 105. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01838-1>

Novacco, M., Meli, M. L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M. G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapiço, T., Willi, B., Wolf, G., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2010). Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4), 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.069>

Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015). Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. And *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites & Vectors*, 8(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>

Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., Hoelzle, L. E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2008). RNase P RNA Gene (*rnpB*) Phylogeny of Hemoplasmas and Other Mycoplasma Species.

*Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1873-1877.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.01859-07>

Piccione, J., Levine, G. j., Duff, C. a., Kuhlman, G. m., Scott, K. d., & Esteve-Gassent, M. d. (2016). Tick-Borne Relapsing Fever in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), 1222-1228. <https://doi.org/10.1111/jvim.14363>

Pires dos Santos, A., Pires dos Santos, R., Biondo, A. W., Dora, J. M., Goldani, L. Z., Tostes de Oliveira, S., Guimarães, A. M. de S., Timenetsky, J., Autran de Moraes, H., González, F. H. D., & Messick, J. B. (2008). Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), 1922-1924. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080964>

Pollack, J. D., Williams, M. V., & McElhaney, R. N. (1997). The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(4), 269-354. <https://doi.org/10.3109/10408419709115140>

Portillo, A., Santibáñez, S., & Oteo, J. A. (2014). Enfermedad de Lyme. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 37-42. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70148-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70148-X)

Ramires, J. A., & Higuchi, M. de L. (2002). Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae se asocian con la inflamación y la rotura de las placas coronarias ateroscleróticas. *Revista Española de Cardiología*, 55, 2-9.

Ravagnan, S., Carli, E., Piseddu, E., Da Rold, G., Porcellato, E., Zanardello, C., Carminato, A., Vascellari, M., & Capelli, G. (2017). Prevalence and molecular characterization of

- canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2069-9>
- Razin, S., & Hayflick, L. (2010). Highlights of mycoplasma research—An historical perspective. *Biologicals*, *38*(2), 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.008>
- Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(4), 1094-1156.
- Rivadeneira-Barreiro, P. E., Montes De Oca-Jiménez, R., Vázquez-Chagoyán, J. C., Martínez-Subiela, S., Morán-Loor, A., Ochoa-García, L., Zambrano-Rodríguez, P. C., Garg, N. J., & Varela-Guerrero, J. A. (2021). Trypanosoma cruzi co-infections with other vector borne diseases are frequent in dogs from the pacific coast of Ecuador. *Microbial Pathogenesis*, *155*, 104884. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104884>
- Robinson, S. J., Neitzel, D. F., Moen, R. A., Craft, M. E., Hamilton, K. E., Johnson, L. B., Mulla, D. J., Munderloh, U. G., Redig, P. T., Smith, K. E., Turner, C. L., Umber, J. K., & Pelican, K. M. (2015). Disease risk in a dynamic environment: The spread of tick-borne pathogens in Minnesota, USA. *EcoHealth*, *12*(1), 152-163. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0979-y>
- Rodríguez-Morales, A. J., Bonilla-Aldana, D. K., Idarraga-Bedoya, S. E., Garcia-Bustos, J. J., Cardona-Ospina, J. A., & Faccini-Martínez, Á. A. (2019). Epidemiology of zoonotic tick-borne diseases in Latin America: Are we just seeing the tip of the iceberg? *F1000Research*, *7*, 1988. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17649.2>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Cob-Galera, L. A., & Domínguez-Alpizar, J. L. (2000). Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatan

- (1984-1999). *REVISTA BIOMÉDICA*, 11(4), Article 4.  
<https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i4.245>
- Rufo, D. G., Sánchez, E. G., Sánchez, J. E. G., & Moro, M. G. (2021). Implicaciones clínicas de las especies del género *Mycoplasma*. *Revista Española de Quimioterapia*, 34(3), 169-184. <https://doi.org/10.37201/req/014.2021>
- Schwan, T. G. (1996). Ticks and *Borrelia*: Model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. *Infectious Agents and Disease*, 5(3), 167-181.
- Schwan, T. G., & Piesman, J. (2002). Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 8(2), 115-121. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010198>
- Schwan, T. G., Schrupf, M. E., Hinnebusch, B. J., Anderson, D. E., & Konkel, M. E. (1996). GlpQ: An antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2483-2492. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.10.2483-2492.1996>
- Shirani, D., Rakhshanpoor, A., Cutler, S. J., Ghazinezhad, B., & Naddaf, S. R. (2016). A case of canine borreliosis in Iran caused by *Borrelia persica*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(3), 424-426. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.020>
- Shmuel, R. (1996). *Micoplasmas*. En *Microbiología médica* (4ta ed.). Galveston (TX): Rama Médica de la Universidad de Texas en Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7637/>
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., & Blanchard, A. (2007). Evolution of mollicutes: Down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158(10), 754-766. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.007>

- Smith, A. J., Oertle, J., & Prato, D. (2014). Chronic Lyme Disease: Persistent Clinical Symptoms Related to Immune Evasion, Antibiotic Resistance and Various Defense Mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Open Journal of Medical Microbiology*, 04(04), 252. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2014.44029>
- Solís-Hernández, A., Rodríguez-Vivas, R. I., Esteve-Gassent, M. D., & Villegas-Pérez, S. L. (2018). Detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en perros y sus garrapatas en comunidades rurales de Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(1), Article 1. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.27776>
- Sotelo Cruz, N., & Valencia Mayoral, P. (2012). Borreliosis, fiebre recurrente causada por espiroquetas. Informe de un caso. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 69(2), 121-125.
- Straubinger, R. K. (2000). PCR-Based Quantification of *Borrelia burgdorferi* Organisms in Canine Tissues over a 500-Day Postinfection Period. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2191-2199.
- Sykes, J. E. (2010). Feline hemotropic mycoplasmas. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 40(6), 1157-1170. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.003>
- Tasker, S. (2022). Hemotropic Mycoplasma. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 52(6), 1319-1340. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.010>
- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Harbour, D. A., Shaw, S. E., Harrus, S., Baneth, G., Lobetti, R. G., Malik, R., Beaufils, J. P., Belford, C. R., & Gruffydd-Jones, T. J. (2003). Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: An International Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3877-3880. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3877-3880.2003>

- Trevisan, G., Cinco, M., Trevisini, S., di Meo, N., Ruscio, M., Forgione, P., & Bonin, S. (2021). Borreliae Part 2: Borrelia Relapsing Fever Group and Unclassified Borrelia. *Biology*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/biology10111117>
- Uribe-Álvarez, C., Chiquete Félix, N., Uribe-Álvarez, C., & Chiquete Félix, N. (2017). Las enfermedades transmitidas por vectores y el potencial uso de Wolbachia, una bacteria endocelular obligada, para erradicarlas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(6), 51-55.
- Volokhov, D. V., Becker, D. J., Bergner, L. M., Camus, M. S., Orton, R. J., Chizhikov, V. E., Altizer, S. M., & Streicker, D. G. (2017). Novel hemotropic mycoplasmas are widespread and genetically diverse in vampire bats. *Epidemiology and Infection*, 145(15), 3154-3167. <https://doi.org/10.1017/S095026881700231X>
- Willi, B., Boretti, F. S., Meli, M. L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2007). Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3798-3802. <https://doi.org/10.1128/AEM.02977-06>
- Willi, B., Meli, M. L., Lüthy, R., Honegger, H., Wengi, N., Hoelzle, L. E., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Development and Application of a Universal Hemoplasma Screening Assay Based on the SYBR Green PCR Principle. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4049-4054. <https://doi.org/10.1128/JCM.01478-09>
- Woese, C. R., Maniloff, J., & Zablen, L. B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 494-498.

- Yin, F., Guo, C., Li, D., Tian, Z., & Li, F. (2023). Molecular Survey and Genetic Characteristics of Vector-Borne Pathogens in Domestic Dogs from Four Regions of China. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(11), 1867. <https://doi.org/10.3390/ani13111867>
- Zannou, O. M., Ouedraogo, A. S., Biguezoton, A. S., Abatih, E., Coral-Almeida, M., Farougou, S., Yao, K. P., Lempereur, L., & Saegerman, C. (2021). Models for Studying the Distribution of Ticks and Tick-Borne Diseases in Animals: A Systematic Review and a Meta-Analysis with a Focus on Africa. *Pathogens*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070893>

## ANEXOS

### ANEXO A: SECUENCIAS DE LOS PRIMERS

Gen	Primer	Secuencia
β Actina	Forward	5' TTTGCGGATCCACATCTGCTGGAG 3'
	Reverse	5' GATACAGGTACCACTCATAAATGAGACCATCACG 3'
16S <i>Borrelia</i> spp.	M1 (F)	5' ACGATGCACACTTGGTGTTAA 3'
	M2 (R)	5' TCCGACTTATCACCGGCAGTC 3'
16S <i>Mycoplasma</i> spp.	Forward	5' GCAATRCCATGTGAACGATGAAA 3'
	Rev 1	5' GGCACATAGTTTGCTGTCACTTT 3'
	Rev 2	5' GCTGGCACATAGTTAGCTGTCACT 3'

### ANEXO B: TOTAL DE MUESTRAS RECOLECTADAS DE CANINOS

Localidad	Muestras	Porcentaje
Quito	3	1,60
Yasuní	44	23,53
Rocafuerte	32	17,11
Las Peñas	7	3,74
Mindo	22	11,76
Santo Domingo	27	14,44
Riviera del Napo	52	27,81
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>100,00</b>

### ANEXO C: TOTAL MUESTRAS POSTIVAS A *Mycoplasma* spp. EN PERROS

Province	Positive	Percentage
Yasuni	2	12,5
Rocafuerte	7	43,75
Las Peñas	3	18,75
Mindo	4	25
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>100</b>

### ANEXO D: MELTING TEMPERATURES OF POSITIVE SAMPLES AMPLIFIED BY SYBR GREEN PCR FOR *Mycoplasma* spp.

N°	Sample code	Melting temperature (°C)
1	Simón	73,5
4	Kae	73,5
5	P29	73,5
6	P33	73,5
7	G48	73,5
8	G49	73,5
9	G53	73,5
11	G68	73,5
12	G73	73,5
13	G75	73,5
14	G78	73,5
15	G80	73,5
16	G81	73,5
17	GS4	72,5

ANEXO D: FILOGENIA DE ESPECIES DE *Mycoplasma* AMPLIFICADAS