

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Detección de *Ehrlichia* spp. en las diferentes regiones del Ecuador**

**Karen Anabel Moyano Lozada**

**Biología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
ingeniera en biología

Quito, 20 de diciembre de 2023

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Detección de *Ehrlichia* spp. en las diferentes regiones del Ecuador**

**Karen Anabel Moyano Lozada**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Verónica Barragán, Ph.D**

Quito, 20 de diciembre de 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.

Nombres y apellidos: Karen Anabel Moyano Lozada

Código: 00212947

Cédula de identidad: 1850460468

Lugar y fecha: Quito, 13 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## **UNPUBLISHED DOCUMENT**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 capstone 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>.

## RESUMEN

A nivel mundial se han identificado varias enfermedades en animales asociadas a rickettsias de la familia Anaplasmataceae. Una enfermedad de gran relevancia producida por estas bacterias en perros es la ehrlichiosis canina, la cual presenta altos índices de contagio. En este estudio se determina la presencia de *Ehrlichia* en perros domésticos que viven en las zonas rurales de cinco provincias del Ecuador y se identifica las especies de esta bacteria mediante secuenciamiento de ADN utilizando la tecnología de Oxford Nanopore. Para esto se analizaron muestras de sangre de perros de Rocafuerte, Las Peñas, La Concordia, Pesillo y Yasuní, las cuales fueron sometidas a detección molecular de la familia Anaplasmataceae. Como resultado se obtuvo una positividad del 38.7% en Rocafuerte ubicada en la Provincia de Manabí, siendo este el lugar con mayor presencia de *Ehrlichia*. registrado en comparación con las otras localidades. La especie encontrada en la mayor parte de los lugares fue *Ehrlichia canis*. Aunque también se registraron *Ehrlichia* spp. Es importante continuar con estudios que permitan comprender la prevalencia de ehrlichias en el Ecuador debido al potencial zoonótico de este patógeno. Especialmente se debe concentrar estudios en zonas rurales del Ecuador en donde la interacción entre animales humanos y no humanos es muy cercana.

**Palabras clave:** Ehrliquiosis canina, *Ehrliquia*, *Ehrliquia canis*, *Ehrliquia* spp, Ecuador, Rocafuerte, Santo Domingo, Pesillo, La Concordia, Yasuní

## ABSTRACT

Several animal diseases associated with rickettsiae of the Anaplasmataceae family have been identified worldwide. One disease of great relevance in dogs is canine ehrlichiosis, which presents high infection rates due to the degree of exposure of the animals. In this study we determined the presence of *Ehrlichia* in domestic dogs living in rural areas of five provinces of Ecuador and identified the inhabitant species by sequencing with Oxford Nanopore technology. Blood samples from dogs from Rocafuerte, Las Peñas, La Concordia, Pesillo and Yasuní were analyzed and subjected to molecular detection by conventional PCR. As a result, a positivity of 38.7% was obtained in Rocafuerte, located in the province of Manabí, this being the highest percentage recorded in comparison with the other localities. The species found in most of the localities was *Ehrlichia canis*. Although *Ehrlichia* spp. were also recorded, which require future studies for their genotyping, due to the zoonotic potential of this pathogen. These results emphasize the importance of continuing this research in other rural areas of Ecuador.

**Key words:** Canine ehrlichiosis, Ehrliquia, Ehrliquia canis, Ehrliquia spp, Ecuador, Rocafuerte, Santo Domingo, Pesillo, La Concordia, Yasuní.

**TABLA DE CONTENIDO**

INTRODUCCIÓN .....	9
MÉTODOS .....	13
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN .....	16
CONCLUSIONES .....	20
FIGURAS .....	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. NÚMERO DE CASOS POSITIVOS REPRESENTADOS POR PROVINCIA DE ACUERDO CON LOS DATOS OBTENIDOS POR CADA LOCALIDAD.....	21
FIGURA 2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN 16SRRNA DE <i>EHRlichia canis</i> .....	22



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se han identificado numerosos patógenos transmitidos por garrapatas que afectan tanto a animales como a humanos en todo el mundo, estos son los hemoparásitos potencialmente emergentes zoonóticos (Salazar, 2014). Entre estas afecciones, se destaca la erliquiosis, la cual es producida por rickettsias del género *Ehrlichia* perteneciente a la familia Anaplasmataceae que incluyen *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, entre otras (McBride, 2009).

Las ehrliquias son microorganismos gramnegativos, generalmente redondos, a veces pleomórficos, pequeños de hasta 1.5  $\mu\text{m}$  que ingresan a la célula a través de fagocitosis y se replican dentro de una vacuola intracelular (Reller & Dumler, 2015). De esta manera se multiplican en grandes cantidades hasta la formación de una estructura que bajo el microscopio se ve como una agregación del patógeno a la que se le conoce como mórula. El género *Ehrlichia* infecta a diferentes células sanguíneas hematopoyéticas (Borras et al., 2019). Las especies *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* infectan linfocitos y monocitos y *Ehrlichia ewingii* presentan tropismo por granulocitos (Dolz et al., 2013).

La erlichiosis monocítica Canina (EMC) es una enfermedad causada principalmente por la bacteria intracelular obligada *Ehrlichia canis*, y es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata parda del perro y *Dermacentro variabilis* de manera experimental, la cual ocurre en forma transestadial y no transovárica. Es decir, en el caso de que la garrapata se infecte durante la etapa larval, almacena al patógeno durante sus estadios de vida en el intestino y glándulas salivales y puede inocular a diferentes hospedadores ya sea en la etapa ninfa como en la adulta (López, 2012). Aunque también se ha evidenciado caninos infectados con *Ehrlichia ewingii* y *E. chaffeensis*, ambas especies transmitidas por la garrapata *A. americanum*, las cuales causan la misma

enfermedad, pero con una distribución específica en el suroeste de Estados Unidos (Heyman et al., 2007).

La bacteria se transmite por la picadura de la garrapata infectada, cuando el vector se alimenta de sangre del hospedador los contamina a través de secreciones salivales, siendo las garrapatas las portadoras de la enfermedad (Zumba, 2023). La infección dentro del hospedero es diseminada vía sanguínea o linfática dentro de las células mononucleares infectadas, de esta forma es como llega a otros sistemas orgánicos (Huerto et al., 2015).

La ehrlichiosis puede presentar 3 fases después del periodo de incubación, el cual puede variar entre 8 y 20 días. Los perros infectados pueden presentar infección aguda, subclínica o crónica con signos inespecíficos como depresión, fiebre elevada, escalofríos, anorexia, anemia y pérdida de peso signos clínicos como hepatomegalia, trombocitopenia, esplenomegalia y hemorragias (Neer, 2000). Durante la primera fase, *Ehrlichia* entra en los leucocitos presentes en los ganglios linfáticos, bazo, hígado, médula espinal y sangre, esta fase se manifiesta hasta la tercera semana después de la infección. En la fase subclínica el sistema inmune es estimulado con el antígeno presente en las células infectadas. Esta fase puede durar de meses a varios años en donde el animal puede eliminar el microorganismo o puede progresar a la siguiente fase. Los perros que no son tratados adecuadamente se caracterizan por ser portadores sanos, ya que pueden albergar a la bacteria en el bazo, órgano más susceptible a esta causa (Faria, 2015). Finalmente, en la fase crónica se manifiesta con alteraciones hematológicas como la trombocitopenia, esplenomegalia o como una enfermedad leve (Archila, 2018)

La EMC presenta gran relevancia en la salud animal por ser considerada de alta mortalidad en perros domésticos con distribución mundial (Harrus et al. 2012), esto último está en concordancia con la distribución del vector responsable de la transmisión. Esta enfermedad se

considera endémica en los países tropicales y subtropicales, donde mayormente habita el vector. Se ha identificado la presencia de *E. canis* en diferentes países, entre ellos incluyen Costa Rica, Venezuela, Colombia, Canadá, Italia, Portugal, México, España, Japón y Estados Unidos.

En Ecuador a pesar de que la erlichiosis canina ha sido identificada, muy pocos han sido los estudios que se han realizado sobre esta enfermedad. Según Cañar et al., (2023) en el cantón Naranjal perteneciente a la Provincia de Guayas encontró positividad en 18 de 34 muestras analizadas. En Guayaquil se evidenció una tasa de infección del 2.2% por Moré, (2015). Mientras que en las islas Galápagos en Puerto Ayora, Jiménez (2020) encontró una prevalencia del 12.1% para *E. canis*. Además, de estos estudios realizados con técnicas moleculares, otros mayormente utilizan técnicas de inmudiagnóstico, visualización microscópica y tests rápidos, los cuales tienden a ser menos sensibles (Dávalos & Melchiade, 2018).

Para identificar la especie de *Ehrlichia* presente en los perros de este estudio, se utilizó un fragmento del gen 16S rARN, que posibilita la diferenciación entre los géneros de la familia Anaplasmataceae. Gracias al avance de nuevas tecnologías, se ha implementado el secuenciamiento de tercera generación, permitiendo la recuperación de la mayor parte de las secuencias genéticas del gen 16S rARN, el cual posibilita la diferenciación entre las especies del género (Frisby, 2015).

A nivel mundial, hay un alto índice de contagios de ehrlichiosis canina debido al grado de exposición a los que están expuestos los animales sin hogar o a los que viven en zonas rurales agropecuarias. Esta situación no es ajena a nuestro país, donde se observan animales interactuando con ganado vacuno o porcino, proporcionando un entorno propicio para que las garrapatas encuentren fácilmente nuevos hospedadores, además que el clima favorece la supervivencia del parásito hasta que localiza a otro anfitrión. Es así como su distribución global entre otros reportes

de prevalencia convierte a la erlichiosis canina en una de las enfermedades de gran relevancia en clínica veterinaria. En este contexto, es crucial implementar un diagnóstico, control y estrategias de prevención para evitar la transmisión de estas enfermedades (Franco, 2021).

El objetivo de este estudio es determinar la positividad de *Ehrlichia* en una muestra pequeña de perros domésticos que viven en las zonas rurales de diversas provincias del Ecuador (Esmeraldas, Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha y Orellana). Además se busca identificar qué especies del patógeno habitan en estos individuos, mediante secuenciamiento utilizando la tecnología de Oxford Nanopore.

## MÉTODOS

### Colección de muestras

Se colectaron un total de 164 muestras de sangre de perros a través de venopunción de la vena cefálica. Las muestras se colocaron en tubos estériles al vacío con EDTA y se conservaron a temperatura de congelación hasta su procesamiento. Estas muestras fueron colectadas en Esmeraldas “Las Peñas” (n=8), Santo Domingo “La Perla” (n=50), en Manabí “Rocafuerte” (n=31), Pichincha “Pesillo” (n=30) y en Orellana “Yasuní” en comunidades kichwa y huaorani (n=75). Esta colección de muestras se realizó con el apoyo de Wildlife Conservation Society, COCIBA Grant, Gabriela Ortiz, Eduardo Díaz y Carolina Sáenz

### Extracción de ADN a partir de las muestras de sangre

Se utilizó el kit comercial PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para descartar la posibilidad de falsos negativos debido a la presencia de compuestos inhibitorios de la PCR, se amplificó el gen  $\beta$ -actina (du Breuil et al., 1993). Todas las muestras amplificaron por lo que asumimos la ausencia de inhibidores en la PCR. La detección de ADN de *Ehrlichia* spp. se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 1174pb con primers específicos para un fragmento del gen 16s rRNA de la familia *Anaplasmataceae*. Los primers utilizados fueron ANA-16s-F2 TGGCAGACGGGTGAGTAATG y ANA-16S-R2 AGAGRACAATCCGAACTGAG con una concentración de 10  $\mu$ M. Se realizaron reacciones de 12,5ul de volumen final utilizando la enzima Polimerasa Taq Platinum (Invitrogen, Brazil).

Las condiciones utilizadas se describen a continuación: denaturación a 94°C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30s) y una extensión final de 72°C a 7 min. Se utilizó como control positivo una muestra positiva confirmada en estudios

anteriores. Los amplicones obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en el fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc XR+ bajo luz UV. Las muestras positivas fueron seleccionadas para realizar un posterior secuenciamiento de los amplicones.

### **Identificación de *Ehrlichia* mediante secuenciamiento**

Los amplicones obtenidos se purificaron utilizando el kit AMPure (Beckman Coulter, CA, EE. UU.) siguiendo las pautas del fabricante con una concentración de beads de 0.4x. Para la preparación de la librería se utilizó el kit Oxford Nanopore Native Barcoding Expansion 96 con el kit Ligation Sequencing LSK-109 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) y se cargaron 3fmol de librería en una flow cell en GridION Mk1 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). La secuenciación se monitoreó utilizando el software MinKNOW v. 22.12.5 y finalizó después de 19h13min. Se utilizó el mismo programa para el base calling con la configuración de High Accuracy, luego se realizó el “demultiplexing” en tiempo real utilizando el software MinKNOW v. 22.12.5. La secuenciación de amplicones se realizó en el Centro de Bioinformática del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Las secuencias consenso se obtuvieron utilizando la herramienta Amplicon Sorter (Vierstraete & Braeckman, 2022). Se utilizaron parámetros predeterminados con una longitud mínima de 1100 pb y una longitud máxima de 1300 pb. La identificación de las especies de *Ehrlichia* se confirmó utilizando la herramienta Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para confirmar la identificación se construyó un árbol filogenético, el modelo utilizado fue de Máxima Verosimilitud con un parámetro Tamura Nei que se predijo en MEGA v. 11 (Tamura et al., 2021) y se realizaron 1000 bootstraps.

## RESULTADOS

### **Detección de *Ehrlichia* en muestras de sangre de perros de las diferentes provincias**

El ADN de *Ehrlichia* fue detectado en 21 de 164 muestras colectadas en diferentes sitios del Ecuador, siendo Rocafuerte ubicada en Manabí, la localidad con un mayor porcentaje de positividad 38.70% (12/31). Seguida de la localidad de La Perla en Santo Domingo y las Peñas en Esmeraldas con un porcentaje de positividad de 12% (6/50) y 25% (2/8) respectivamente. En Yasuní se encontró 1.33% (1/75) y finalmente no se encontró positivos en muestras de Pesillo en Cayambe, así lo explica la **Figura 1**.

### **Identificación de la especie de *Ehrlichia***

Se obtuvieron 22 secuencias consenso de las cuales 20 mostraron más del 99% de similitud con *Ehrlichia canis*, mientras que otras dos secuencias se alinearon a especies de *Ehrlichia* no cultivadas. Una secuencia sea alineó con *Anaplasma platys*, antiguamente conocida como *Ehrlichia platys* en otro clado (Dumblor et al., 2001). Esta última fue utilizada como outgroup.

## DISCUSIÓN

Este estudio evaluó la positividad de *Ehrlichia* en perros de zonas rurales en diferentes provincias del Ecuador. Rocafuerte, un cantón perteneciente a la provincia de Manabí presentó la mayor cantidad de perros infectados con *Ehrlichia* sp, seguido de Las Peñas y la Concordia. Estos porcentajes de positividad encontrados en provincias de la costa pueden deberse principalmente a que las condiciones ambientales como el clima y temperatura son favorables para el desarrollo del vector, lo que facilita la aparición y transmisión de enfermedades (Pulido, 2015). MCown et al (2011) reporta una situación similar en otras zonas de Manabí, obteniendo una positividad para la misma especie de *Ehrlichia* en el 13.64% de perros analizados en Chone y en el 52% en Manta. Aunque este último porcentaje es un poco más elevado que Rocafuerte se debe considerar que los estudios de MCown et al (2011) contienen un tamaño de muestra más grande, lo que recalca la necesidad de continuar con este tipo de estudios en la provincia.

Según Ribeiro (2016), las garrapatas son frecuentes en parques naturales, reservas y áreas de conservación, donde existe una gran biodiversidad por lo que hay una variedad de posibles hospederos. Esto ya ha sido reportado en Brasil en donde se ha detectado *E.canis* en perros de monte (*Speothos venaticus*) con un positividad del 11.1% y en zorros cangrejeros (*Cerdocyon thous*) un 10% (André et al., 2010). Sin embargo, nuestras muestras colectadas en La Concordia, específicamente una zona ubicada alrededor del Bosque protector La Perla, no mostraron positividad, es posible que esto se deba a que Shepard (2007) ha priorizado la conservación del bosque protector y creando un centro de rescate de vida silvestre en han establecidos reglas para erradicar pulgas y garrapatas (Ministerio de Turismo, s.f). De esta manera se podría justificar la baja positividad de *Ehrlichia* en el lugar. Estas medidas han ayudado a mitigar el riesgo de que



perros infectados puedan ingresar a las zonas de vida silvestre y exponer a cánidos silvestres a la infección.

Por otro lado, a pesar de que se ha reportado que la erlichiosis es enzootica en regiones tropicales y subtropicales en Yasuní se encontró solo 1 positivos de 75 muestras analizadas (Sosa-Gutiérrez et al., 2016). Esto podría ser debido a que las comunidades huaorani y kichwa poseen pocos habitantes, lo que resulta en una baja densidad de perros en comparación con las comunidades muestreadas en la Costa. Lo mismo ocurre con la densidad de animales de granja en las zonas muestreadas, como por ejemplo las vacas que pueden albergar grandes cantidades de garrapatas. En esta zona también existe el riesgo de que, si los perros tienen garrapatas, infecten a fauna silvestre, el contacto de los perros con estos animales incrementa en zonas en donde las comunidades utilizan a perros para ayudar en la cacería de subsistencia. El ingreso de estos perros al bosque podría derivar en un problema de conservación, tal como lo describe Criado-Fornelio et al. (2018), quien reporta la transmisión de garrapatas infectadas por *E. canis* entre perros domésticos y carnívoros salvajes, y viceversa.

En Pesillo parroquia de Cayambe no se detectó *Ehrlichia*, esto puede deberse principalmente a la ausencia del vector en zonas andinas. Nuestros resultados coinciden con el estudio realizado por Pesquera et al., (2015), donde analizaron la presencia de garrapatas en 6 tapires andinos y ganado vacuno en la zona del Antisana en Pichincha. Lo que corrobora el análisis de Salazar et al., (2014), quien indica que existen aspectos determinantes en la prevalencia de la enfermedad como es la probabilidad de contacto con el vector y la falta de control de garrapatas.

En otros países de América del sur se ha detectado un 33.1% y 25.3% de positividad en zonas rurales tropicales de México y Colombia respectivamente, los cuales

muestran porcentajes similares de positividad (Pat et al., 2015, Vargas et al., 2012). En el caso de Perú, se encontró un 16,5% de prevalencia en el caserío “La isla”, una zona de clima templado, en donde no se había reportado el vector. Al respecto los autores sugieren que sus resultados pueden estar reflejando las consecuencias del incremento de temperatura por el calentamiento global, lo que podría estar contribuyendo a la propagación de las garrapatas y de patógenos asociados a estos vectores y la presencia de la enfermedad en áreas no endémicas.

La coinfección de *E. canis* con otros hemoparásitos es muy común. En Colombia en la región de Magdalena se encontró que 11 perros de 164 estaban coinfectados por *A. platys* y *E. canis* (Pesapane et al., 2019). En Nicaragua se detectó la presencia de *Ehrlichia canis* con *A. platys* y *A. phagocytophilum* en un 5.3% y 2.2% respectivamente (Springer, 2018). En México Melina et al., (2019) demostró una seroprevalencia de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. del 24.9%. En Venezuela se registró el primer reporte de *E. chaffensis* en Sudamérica y este se encontraba acompañado de *E. canis* en dos perros (Gutiérrez, 2008). Frecuentemente se han ido evidenciando coinfecciones, las cuales pueden aumentar la complejidad y la gravedad de la enfermedad, es así como se establece la importancia de realizar estudios que no solo indique la prevalencia de *Ehrlichia canis* sino también que identifiquen estas co-infecciones (Bonilla-Aldana et al., 2022).

Estudios futuros deben también enfocarse en genotipificar *Ehrlichia* spp. en perros domésticos del país, debido al potencial zoonótico de este patógeno y al impacto que puede tener en la salud humana. Un claro ejemplo es el caso de la variante venezolana de *E. canis* (VHE), identificada en el 2006 en pacientes humanos con signos clínicos de ehrliquiosis humana como fiebre y anemia, debilidad, náuseas y dolor de cabeza. Durante este brote el 30% (6 de 20) pacientes fueron positivos a la presencia de *Ehrlichia canis* con mutaciones características de la variante VHE (Perez et al., 2006). Esto recalca la importancia de comprender el comportamiento de la

ehrlichiosis en perros y de desarrollar estrategias preventivas, especialmente dado que no existen vacunas disponibles contra el patógeno. Es importante destacar que los perros desempeñan un papel crucial como hospederos definitivos de las garrapatas que actúan como vectores de estas enfermedades. Por lo tanto, es relevante concientizar a los dueños sobre la necesidad de brindarles todos los cuidados y supervisión adecuada para evitar posibles problemas de salud tanto en animales domésticos como silvestres, así como en seres humanos.

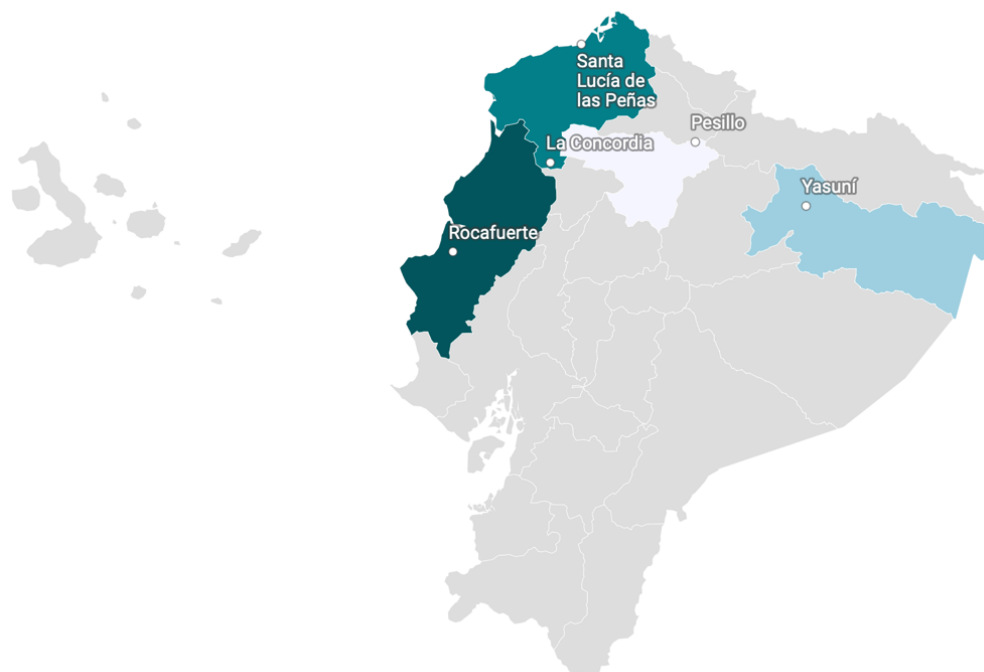
## CONCLUSIONES

El presente estudio identifica a *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia* sp. en varios sectores rurales de 5 provincias del Ecuador. Rocafuerte, un cantón perteneciente a la provincia de Manabí, presenta la mayor cantidad de perros infectados, seguido de Las Peñas en Esmeraldas y la Concordia en Santo Domingo. Nuestros resultados recalcan la importancia de realizar estudios similares en otras zonas del país, en donde hay evidencia de una alta densidad del vector.

## FIGURAS

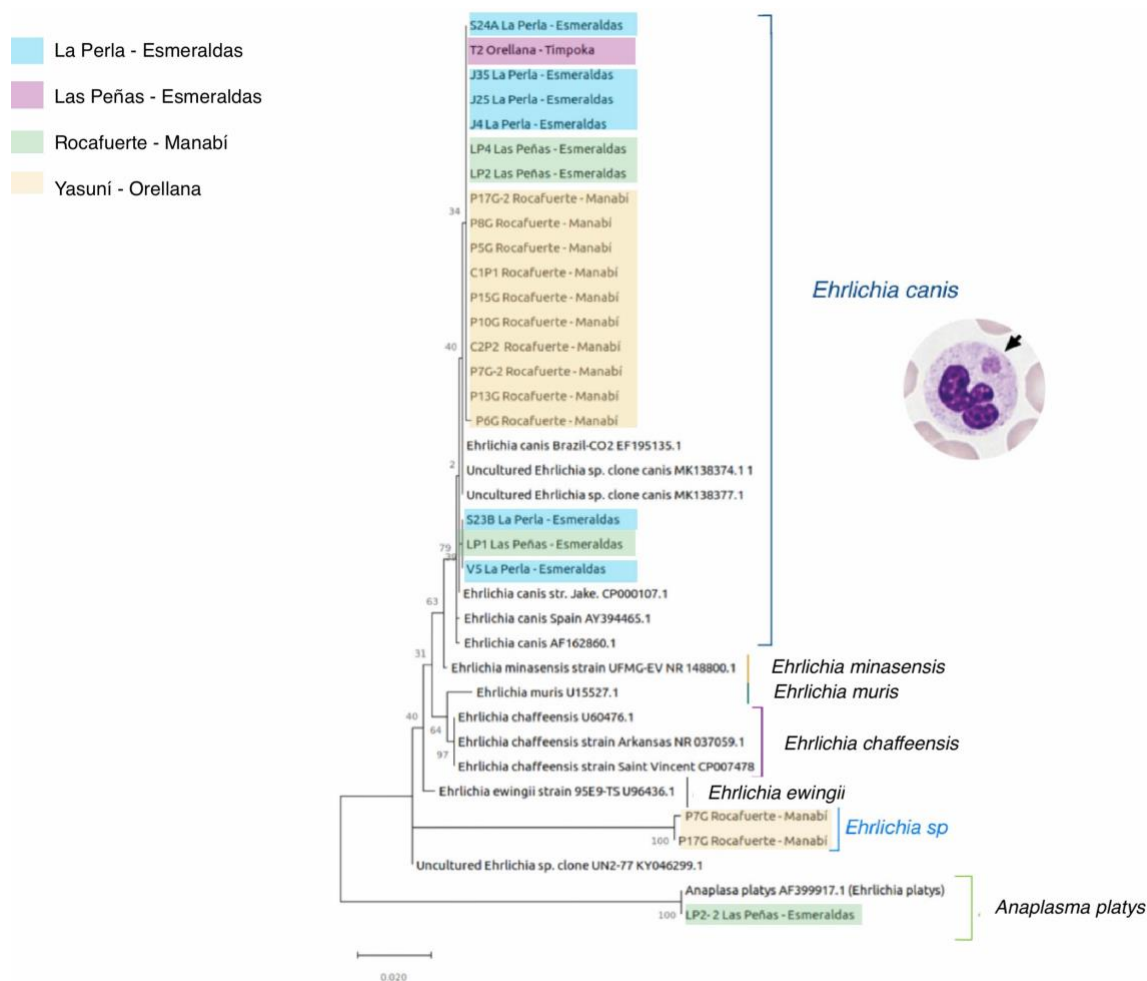
## Porcentaje de casos positivos

■ ≥ 24% ■ 11%-24% ■ 4%-11% ■ 1%-4% ■ < 1%



**Figura 1. Número de casos positivos representados por provincia de acuerdo con los datos obtenidos por cada localidad.**

El mayor porcentaje de positividad se encuentra en Rocafuerte perteneciente a la provincia de Manabí resaltado con un color azul más oscuro, siendo el 38.7%. Seguido se encuentra las Peñas con 25% y La Concordia con un 12%. Con colores más tenues se encuentra Pesillo y Yasuní con 0% y 1.33% de positividad respectivamente



**Figura 2. Análisis filogenético del gen 16SrRNA de *Ehrlichia canis***

Este árbol filogenético es construido con secuencias de varias especies de otros lugares y con las secuencias encontradas en este estudio. Las secuencias son etiquetadas con diferentes colores de acuerdo con el lugar de donde provienen. Se utilizó el método Maximum Likelihood y el parámetro Tamura-Nei. Se utilizó como grupo externo *Anaplasma platys*. Los números de acceso para cada referencia utilizada se encuentran al lado de esta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borrás, Pablo, Sanchez, Juliana, Guillemi, Eliana, De La Fourniere, Sofía, Abadia, Mercedes, Farber, Marisa, & Santini, María Soledad. (2019). Detección de bacterias de los géneros Ehrlichia, Anaplasma y Rickettsia en garrapatas Rhipicephalus sanguineus s.l en Pergamino, Argentina. *Revista Argentina de Salud Pública*, 10(41), 8-13. Epub 01 de diciembre de 2019. Recuperado en 06 de diciembre de 2023, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1853-810X2019000400008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-810X2019000400008&lng=es&tlng=es).
- Bonilla-Aldana, D. K., Gutiérrez-Grajales, E. J., Osorio-Navia, D., Chacón-Peña, M., Trejos-Mendoza, A. E., Pérez-Vargas, S., Valencia-Mejía, L., Marín-Arboleda, L. F., Martínez-Hidalgo, J. P., Reina-Mora, M. A., González-Colonia, L. V., Cardona-Ospina, J. A., Jiménez-Posada, E. V., Díaz-Guio, D. A., Salazar, J. C., Sierra, M., Muñoz-Lara, F., Zambrano, L. I., Ramírez-Vallejo, E., . . . Rodríguez-Morales, A. J. (2022). Haematological Alterations Associated with Selected Vector-Borne Infections and Exposure in Dogs from Pereira, Risaralda, Colombia. *Animals*, 12(24), 3460. <https://doi.org/10.3390/ani12243460>
- Cañar-Romero, P. M., Vallecillo, A. J., & Castillo-Hidalgo, E. P. (2023). Detección de material genético mediante reacción en cadena de polimerasa en muestras de caninos seropositivos a Ehrlichia canis. *MQR Investigar*, 7(2), 1188–1200. <https://doi.org/10.56048/mqr20225.7.2.2023.1188-1200>
- Criado-Fornelio A, Martín-Pérez T, Verdú-Expósito C, Reinoso-Ortiz SA, Pérez-Serrano J. Molecular epidemiology of parasitic protozoa and *Ehrlichia canis* in wildlife in Madrid (central Spain). *Parasitol Res.* (2018) 117:2291–8. doi: 10.1007/s00436-018-5919-2

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., ... &

Rurangirwa, F. R. (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 combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2145-2165.

Geiger J, Morton BA, Vasconcelos EJR, Tngrian M, Kachani M, Barrón EA, Gavidia CM,

Gilman RH, Angulo NP, Lerner R, Scott T, Mirrashed NH, Oakley B, Diniz PPVP.

Molecular Characterization of Tandem Repeat Protein 36 Gene of Ehrlichia

canis Detected in Naturally Infected Dogs from Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2018

Aug;99(2):297-302. doi: 10.4269/ajtmh.17-0776. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29943707;

PMCID: PMC6090345.

Gutiérrez, C. N., Martínez, M., Sánchez, E., De Vera, M., Rojas, M., Ruiz, J., & Triana-Alonso,

F. J. (2008). *Cultivation and molecular identification of Ehrlichia canis and Ehrlichia*

*chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. *Veterinary Clinical Pathology*,

37(3), 258–265. doi:10.1111/j.1939-165x.2008.00046.x

HEYMAN P, Duh D, Van Der Kuylen B, Cochez C, Van Esbroeck M, Vandenvelde C, Avsic-

Zupanc T. Molecular and Serological Evidence for Anaplasma platys and Babesia sp.

Infection in a Dog, Imported in Belgium, from Southern Spain. *J. Vet. Med. A.* 2007; 54:

276-279. PMID: 17523964 DOI: 10.1111/j.1439-

0442.2007.00872.x <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17523964>



- Jimenez, I. A., Mariño, P. A. V., Stapleton, G. S., Prieto, J. B., & Bowman, D. D. (2020). Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *19*, 100373.
- López Javier, Abarca Katia, Mundaca M. Isabel, Caballero Carla, Valiente- Echeverría Fernando. Identificación molecular de Ehrlichia canis en un canino de la ciudad de Arica, Chile. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2012 Oct [citado 2016 Ago 11]; *29*(5): 527-530.
- Melina M. Ojeda-Chi, Roger I. Rodriguez-Vivas, Maria D. Esteve-Gasent, Adalberto A. Pérez de León, Joseph J. Modarelli, Sandra L. Villegas-Perez, Ehrlichia canis in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 67, 2019, 101351, ISSN 0147-9571, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>.
- McBride, J. W. (2009). *Ehrlichia. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*, 919–937. doi:10.1016/b978-0-12-369408-9.00047-0
- McCown, M., Monterroso, V. H., & Grzeszak, B. (2014). Zoonotic and Infectious Disease Surveillance In Ecuador: Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi. *J. Spec. Operations Med.*, *11*, 61-65.
- Moré, G. A. (2014). *Diagnóstico hematológico y caracterización de patógenos transmitidos por vectores en caninos de la ciudad de Guayaquil, Ecuador*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/51384>
- Pat-Nah, H., Rodriguez-Vivas, R. I., Bolio-Gonzalez, M. E., Villegas-Perez, S. L., & Reyes-Novelo, E. (2015). Molecular diagnosis of Ehrlichia canis in dogs and ticks Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, *52*(1), 101-104.

- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human Infection with Ehrlichia Canis Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>
- Pesapane R, Foley J, Thomas R, Castro LR. Molecular detection and characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from northern Colombia. *Vet Microbiol*. 2019 Jun;233:184-189. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.05.002. Epub 2019 May 4. PMID: 31176406.
- Pesquera, C., A. Portillo, A. M. Palomar, y J. A. Oteo. 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 and Vectors* 8:1-10.
- Ribeiro H, Luiz J, Faccini H, Landulfo GA, Pereira B. 2016. New host records of ticks (*Ixodidae*) infesting birds in an Atlantic Forest fragment in southeastern Brazil. *Syst. Appl. Acarol*. 21: 1107–1115.
- Reller, M. E., & Dumler, J. S. (2015). Ehrlichia , anaplasma , and related intracellular bacteria. In *ASM Press eBooks* (pp. 1135–1149). <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch65>
- Schön, M.E., Martijn, J., Vosseberg, J. *et al*. The evolutionary origin of host association in the Rickettsiales. *Nat Microbiol* 7, 1189–1199 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01169-x>
- Springer A, Montenegro VM, Schicht S, Pantchev N, Strube C. Seroprevalence and current infections of canine vector-borne diseases in Nicaragua. *Parasit Vectors*. 2018 Nov 12;11(1):585. doi: 10.1186/s13071-018-3173-1. PMID: 30419951; PMCID: PMC6233566.

Sosa-Gutierrez, Carolina. (2016). First phylogenetic analysis of Ehrlichia canis in dogs and ticks from Mexico. Preliminary study. *Revista MVZ Córdoba*. 21. 5569-5576.

Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary parasitology*, 186(3-4), 254-260.