

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Detección de bacterias hemotróficas (*Anaplasmataceae*, *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp.) en sangre de perros domésticos de distintas localidades rurales del Ecuador

Giuliana Sofía Pazmiño Zurita

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Detección de bacterias hemotróficas (*Anaplasmataceae*, *Borrelia* spp. y *Mycoplasma* spp.) en sangre de perros domésticos de distintas localidades rurales del Ecuador

Giuliana Sofía Pazmiño Zurita

Nombre del profesor, Título académico

Verónica Barragán, PhD

Quito, 18 de diciembre de 2024

© 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: Giuliana Sofía Pazmiño Zurita

Código: 00211869

Cédula de identidad: 0604388991

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Este estudio analizó la prevalencia de bacterias hemotróficas en perros domésticos de áreas rurales en Ecuador, empleando un enfoque de biología molecular y secuenciación de nueva generación. Se incluyeron 358 muestras provenientes de ocho localidades rurales de 6 regiones naturales del país. El ADN se extrajo de muestras de sangre y se emplearon primers específicos dirigidos a la región 16S rRNA para la detección de bacterias de las familias *Anaplasmataceae* y *Borrelia* spp. por PCR, y *Mycoplasma* spp. mediante qPCR. Adicionalmente, se realizó secuenciación con tecnología de Nanopore en un subconjunto de 45 muestras para identificar especies específicas de *Anaplasmataceae*. Los resultados mostraron una positividad general del 33.8% para *Anaplasmataceae* y del 12.9% para *Mycoplasma* spp., sin detección de *Borrelia* spp. La coinfección de *Anaplasmataceae* y *Mycoplasma* spp. fue detectada en el 6.98% de las muestras, con mayor prevalencia en localidades como Riviera del Napo. La secuenciación reveló la presencia de *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* y *Wolbachia* endosimbionte de *Dirofilaria immitis*, siendo la coinfección más común entre *A. platys*, *E. canis* y *Wolbachia* (11/33 muestras secuenciadas). Este estudio evidencia la circulación activa de bacterias hemotróficas en regiones cálidas y húmedas, destacando el riesgo zoonótico asociado y la importancia de una vigilancia epidemiológica integrada. La ausencia de *Borrelia* spp. sugiere barreras ecológicas limitantes, aunque no excluye su posible circulación en el país. Estos hallazgos resaltan una prevalencia significativa de bacterias hemotróficas en perros domésticos rurales en Ecuador, lo que subraya la necesidad de mejorar la vigilancia en el marco de Una Salud para mitigar los riesgos de transmisión zoonótica en estas regiones.

Palabras clave: *Anaplasmataceae*, *Borrelia*, *Mycoplasma*, Enfermedades transmitidas por garrapatas, caninos, localidades rurales, Ecuador

ABSTRACT

This study analyzed the prevalence of hemotrophic bacteria in domestic dogs from rural areas in Ecuador, employing a molecular biology approach and next-generation sequencing. A total of 358 samples from eight rural localities across six natural regions of the country were included. DNA was extracted from blood samples, and specific primers targeting the 16S rRNA region were used for the detection of bacteria from the families *Anaplasmataceae* and *Borrelia* spp. by PCR, and *Mycoplasma* spp. via qPCR. Additionally, Nanopore sequencing technology was employed on a subset of 45 samples to identify specific species within *Anaplasmataceae*. The results revealed an overall positivity rate of 33.8% for *Anaplasmataceae* and 12.9% for *Mycoplasma* spp., with no detection of *Borrelia* spp. Coinfections of *Anaplasmataceae* and *Mycoplasma* spp. were identified in 6.98% of the samples, with higher prevalence in localities such as Riviera del Napo. Sequencing identified the presence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, and *Wolbachia*, an endosymbiont of *Dirofilaria immitis*, with the most common coinfection observed among *A. platys*, *E. canis*, and *Wolbachia* (11/33 sequenced samples). This study highlights the active circulation of hemotrophic bacteria in warm and humid regions, emphasizing the associated zoonotic risk and the importance of integrated epidemiological surveillance. The absence of *Borrelia* spp. suggests ecological barriers limiting its presence, though its potential circulation in the country cannot be excluded. These findings underscore a significant prevalence of hemotrophic bacteria in rural domestic dogs in Ecuador, highlighting the need for enhanced One Health surveillance to mitigate zoonotic transmission risks in these regions.

Keywords: *Anaplasmataceae*, *Borrelia*, *Mycoplasma*, tick-borne diseases, canines, rural localities, Ecuador.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
2. MÉTODOS	15
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSIÓN	20
5. CONCLUSIONES.....	24
6. TABLAS.....	25
7. FIGURAS.....	28
REFERENCIAS.....	33
ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Positividad de bacterias hemotróficas en muestras de sangre de caninos en distintas localidades de Ecuador.....	25
Tabla 2. Coinfecciones <i>Anaplasmataceae</i> y <i>Mycoplasma</i> spp. en muestras de sangre de caninos en distintas localidades de Ecuador.....	26
Tabla 3. Infecciones y co-infecciones de especies de la familia <i>Anaplasmataceae</i> en caninos en distintas localidades de Ecuador.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localidades rurales muestreadas en el territorio ecuatoriano.....	28
Figura 2. Regiones naturales con localidades rurales muestreadas en el territorio ecuatoriano.....	29
Figura 3. Árbol filogenético del género <i>Anaplasma</i> con método Maximum Likelihood.....	30
Figura 4. Árbol filogenético del género <i>Ehrlichia</i> con método Maximum Likelihood.....	31
Figura 5. Árbol filogenético del género <i>Wolbachia</i> con método Maximum Likelihood.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de temperaturas de melting de muestras positivas para <i>Mycoplasma</i> spp.	43
Anexo 2. Especies de bacterias hemotróficas identificadas mediante BLASTn.....	44

1. INTRODUCCIÓN

En localidades rurales, los perros domésticos, mayoritariamente de raza mixta, se caracterizan por su vida al aire libre, el deambular constante en búsqueda de alimento, y la recepción limitada o nula de atención veterinaria. Además, suelen cumplir roles funcionales en actividades económicas como la ganadería y la caza (Haynes et al., 2024). Debido a su comportamiento deambulante, las poblaciones de perros domésticos en áreas rurales interactúan con una amplia variedad de vida silvestre y están expuestas a ectoparásitos, como las garrapatas, que son vectores reconocidos de múltiples enfermedades infecciosas con impacto zoonótico (Haynes et al., 2024).

Por ende, estos animales podrían albergar una alta diversidad de patógenos. Thongsahuan et al. (2020) señala que las infecciones en perros causadas por patógenos transmitidos por garrapatas presentan signos clínicos inespecíficos como fiebre alta, letargia, anorexia, palidez en las membranas mucosas, vómitos y pérdida de peso. Estas manifestaciones clínicas inespecíficas complican significativamente el diagnóstico y el inicio temprano de un tratamiento efectivo. En el contexto de las comunidades rurales, la cercanía entre humanos y perros domésticos aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas. Según explica la Organización Mundial de la Salud (2023), el 60% de enfermedades infecciosas emergentes tiene como origen animales tanto silvestres como domésticos. Por lo tanto, actualmente se impulsa un enfoque global denominado “One Health”, cuyo objetivo es optimizar la salud de personas, animales y ecosistemas a través de la integración y colaboración de estos sectores.

Algunos patógenos de especial interés zoonótico incluyen a individuos de la familia *Anaplasmataceae*, hemoplasmas y *Borrelia*. La familia *Anaplasmataceae* está compuesta por bacterias gram-negativas intracelulares pertenecientes a los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*,

Wolbachia y *Neorickettsia* (Snellgrove et al., 2020). En cuanto a sus características, estas bacterias tienen un alto potencial zoonótico en regiones tropicales y subtropicales, son transmitidas principalmente por garrapatas duras del género *Ixodes* y el complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, conocido comúnmente como garrapata marrón del perro (Merino-Charrez et al., 2021; Thongsahuan et al., 2020). En particular, se presume que la garrapata café del perro, *R. sanguineus* sensu lato, es el vector de *Ehrlichia canis* mientras que *R. sanguineus sensu stricto* tiene mayor competencia vectorial para *Anaplasma platys* (Snellgrove et al., 2020).

Por una parte, la ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad causada por la invasión de monocitos por *Ehrlichia canis*: el patógeno más común detectado en miembros de la familia Canidae incluyendo perros domésticos, zorros, coyotes y chacales (Pérez-Macchi et al., 2019; Bahiense et al., 2020). Aunque la infección puede ser subclínica, Haynes et al. (2024) describe efectos multisistémicos tales como fiebre, anorexia, petequias dérmicas, equimosis, lesiones oftalmológicas e incluso pancitopenia severa. Por otro lado, la anaplasmosis canina también conocida como trombocitopenia cíclica infecciosa (ICT) es causada por la infección intracelular de *Anaplasma platys* en plaquetas (Rubio et al., 2011). Al igual que otras enfermedades potencialmente zoonóticas, la ICT puede ser asintomática o presentar signos de trombocitopenia cíclica con intervalos de 10 a 14 días, bacteriemia, anemia no regenerativa, fiebre, leucopenia, letargia e hipoalbuminemia (Rubio et al., 2011).

Por otro lado, los micoplasma hemotróficos también conocidos como hemoplasmas son bacterias gramnegativas del género *Mycoplasma* caracterizadas por ser pequeñas, cosmopolitas, pleomórficas y difíciles de cultivar. Según explica Beus et al. (2024), los hemoplasmas son capaces de infectar eritrocitos de una amplia gama de mamíferos domésticos y salvajes, incluidos perros, gatos, ganado y, raramente infectan a humanos (Beus et al., 2024). En el caso de perros, las

especies *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) y *Candidatus M. haematoparvum* (CMhp) infectan glóbulos rojos causando anemia hemolítica y otros signos tales como fiebre, apatía, adenopatía, incoordinación motora, esplenomegalia, anorexia, letargo, ictericia, deshidratación, pérdida de peso e incluso muerte súbita. No obstante, estos parásitos eritrocíticos obligados también pueden inducir infecciones intravasculares asintomáticas persistentes en animales. A pesar de la falta de información acerca de su vía de transmisión, Chalker (2005) explica que artrópodos hematófagos, tales como garrapatas *R. sanguineus* sensu lato y pulgas *Ctenocephalides felis* actúan como vectores (Huggins et al., 2023).

Las especies del género *Borrelia* son espiroquetas gramnegativas transmitidas por garrapatas duras del género *Ixodes*, con capacidad de infectar tanto a animales como a humanos, lo que las convierte en patógenos de alto interés epidemiológico (Cook, 2014). A pesar de que se han descrito 18 especies potencialmente patógenas, *Borrelia burgdorferi* permanece como el principal agente de importancia zoonótica causante de la enfermedad de Lyme. En este sentido, Galluzzo et al. (2020) explica que los perros son un reservorio competente para *B. burgdorferi* teniendo generalmente manifestaciones clínicas específicas leves incluyendo cojera, fiebre, anorexia, letargo y linfadenopatía. No obstante, los cuadros graves están caracterizados por artritis y disfunción neurológica. En el caso de seres humanos, la borreliosis de Lyme se caracteriza por un conjunto temprano de síntomas similares a malestar, dolor de cabeza, fiebre, mialgia, artralgia, linfadenopatía, parálisis de los nervios craneales, afecciones oftálmicas, manifestaciones cardíacas y meningitis linfocítica (Skar et al., 2024).

En cuanto al diagnóstico de enfermedades transmitidas por garrapatas, el examen microscópico de frotis de sangre es el método de diagnóstico convencional y de rutina, ya que permite la identificación de parásitos sanguíneos con base en su morfología (Thongsahuan et al.,

2020). A pesar de su bajo costo y utilidad en la detección de infecciones agudas, este método presenta limitaciones significativas, como la necesidad de personal altamente capacitado y una baja sensibilidad en casos de bacteriemia reducida. Estas limitaciones frecuentemente dificultan la implementación de una terapia adecuada y oportuna (Merino-Charrez et al., 2021). Otro método diagnóstico corresponde a las pruebas serológicas; sin embargo, la presencia de reacciones cruzadas impide la determinación del agente infeccioso por lo que no es muy confiable (Merino-Charrez et al., 2021). Por último, una alternativa con alta sensibilidad y especificidad incluye a la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) del patógeno utilizando la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, la aplicación de pruebas moleculares en programas de vigilancia zoonótica se ve limitada por costos relativamente altos en cuanto a reactivos y personal capacitado.

El objetivo principal de esta investigación es detectar ADN de bacterias hemotróficas zoonóticas, incluyendo *Mycoplasma spp.*, *Borrelia spp.*, y miembros de la familia *Anaplasmataceae*, en muestras de sangre de perros domésticos provenientes de comunidades rurales en Ecuador. Los resultados proporcionarán información clave para entender la epidemiología de estas infecciones en áreas rurales y su posible impacto en la salud pública.

2. MÉTODOS

2.1 Recolección y preservación de muestras

Las muestras de sangre de perro fueron colectadas entre noviembre de 2021 y septiembre del 2024 y extraídas por médicos veterinarios por la vía de venopunción. La obtención de muestras se realizó bajo el permiso de investigación 2023-004 (emitido por el comité de Ética en el Uso de Animales en Investigación y Docencia de la USFQ a la Dra. Verónica Barragán) con el consentimiento verbal de los cuidadores de los perros. Se colectaron un total de 358 muestras en diferentes localidades del Ecuador: Santo Domingo localidad Cristo Vive (n=26), Imbabura localidad Pesillo (n=29), Esmeraldas localidad La Perla (n=116) y Las Peñas (n=7), Pichincha localidad Mindo (n=21), Manabí localidad Rocafuerte (n=31), y Orellana localidad Yasuní (n=44), Riviera del Napo (n=51) y Comunidades huaorani (n=32) que abarcan Ganguetapare (n=4), Orellana localidad Guiyero (n=8), Nenkiguiro (n=13) y Timpoka (n=7) [Figuras 1 y 2]. En este sentido, las muestras fueron clasificadas en regiones naturales de acuerdo con la información del Ministerio del Ambiente del Ecuador (2018). Las muestras fueron preservadas en EDTA a 4 °C hasta su procesamiento.

2.2 Extracción de ADN y evaluación de inhibición de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El material genético de las muestras de sangre fue extraído con el kit comercial DNAeasy Blood & Tissue de QIAGEN (Maryland, Estados Unidos) en base al protocolo recomendado por el fabricante. Para descartar la presencia de compuestos inhibidores de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la posibilidad de falsos negativos, se seleccionó de manera aleatoria el 10% de muestras de cada localidad y se realizó la amplificación de un fragmento del gen *β -actina* mediante una PCR convencional según lo descrito por Du Breuil et al. (1993). Todas las muestras

analizadas para la amplificación del gen *β-actina* tuvieron resultados positivos evidentes con la amplificación de un fragmento de 300pb. Al verificar la ausencia de compuestos inhibitorios, se procedió a realizar los PCR para determinar la presencia de ADN de *Borrelia* spp., familia *Anaplasmataceae* y *Mycoplasma* spp.

2.3 Detección de bacterias hemotróficas

Todas las muestras fueron analizadas utilizando tres diferentes ensayos siguiendo los protocolos descritos por sus autores: dos con PCR convencional y uno con qPCR. El primero amplifica una región de ADN del gen 16S rRNA (1174 pb) de la familia *Anaplasmataceae* (Gajadhar et al., 2010), el segundo una región del gen 16S rRNA (358 pb) de *Borrelia* spp. (Lambert et al., 2019). Estos dos ensayos de PCR convencional realizados utilizando TaqPlatinum® (Fisher Scientific, USA) contaron con su respectivo control negativo y control positivo correspondiente a una muestra previamente verificada, los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% después de 30 minutos a 100V. Adicionalmente, las muestras con amplicones positivos fueron guardadas a 4 °C hasta su secuenciamiento. El tercer ensayo fue realizado para la detección de ADN de *Mycoplasma* spp. en base al protocolo de qPCR descrito por Willi et al. (2009) para una región de 132pb del gen 16S rRNA. Todas las corridas de qPCR realizadas utilizando el MasterMix de Promega® (Madison, USA) contaron con su respectivo control negativo y control positivo; y tanto muestras como controles fueron corridos por duplicado para disminuir potenciales errores de operador.

2.4 Evaluación de secuenciamiento de amplicones para identificación de especies de la familia *Anaplasmataceae*

Del total de amplicones con resultados positivos, las 45 muestras con bandas más fuertes fueron seleccionadas para formar parte de un proyecto piloto de secuenciamiento en el Laboratorio

de Bioinformática USFQ utilizando la tecnología de Oxford Nanopore Technologies. Las muestras seleccionadas fueron 15 de Rocafuerte, 3 de Las Peñas, 5 de Cristo Vive, 6 de La Perla, 1 de Mindo, 11 de Rivera del Napo, 1 de TimpoKa y 3 de Yasuní. Se inició con la purificación de los amplicones mediante el protocolo del kit AMPure (Beckman Coulter, USA), luego se procedió a cuantificar el material genético mediante Qubit™ 1X dsDNA (Thermo Scientific, Invitrogen, USA). La librería se preparó utilizando el protocolo Oxford Nanopore Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114-96) junto con el kit Ligation Sequencing LSK-109. Posteriormente, 200 fmol de librería se cargaron en una celda de flujo FLO-MIN114 (FAY07010) y se secuenció en el equipo GridION GXB04074. La corrida fue configurada con super-accurate basecalling de 1200pbs, trimming de barcodes automático para demultiplexing, frecuencia de escaneo de poros cada 1.5 horas y Q score mínimo de 10. Las lecturas fueron procesados con MinKNOW 24.02.16, Bream 7.9.8, Configuration 5.9.18, Dorado 7.3.11 y MinKNOW Core 5.9.12. Finalmente, las secuencias demultiplexadas fueron analizadas a través de la herramienta amplicon_sorter (Vierstraete & Braeckman, 2022) para construir secuencias consenso clasificando amplicones secuenciados en base a la similitud y longitud de lecturas sin referencia. En el caso de las secuencias positivas para la familia *Anaplasmataceae*, las especificaciones para generar el output en amplicon_sorter fueron: -min 1000 -max 1200 -maxr 100000 -np 8 -ar. Las secuencias consenso obtenidas en cada barcode fueron comparadas con secuencias alimentadas en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016) mediante su herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente, el análisis filogenético fue elaborado a través del software MEGA11 versión 11.0.13. a través del alineamiento con secuencias obtenidas de GenBank y la construcción de árboles filogenéticos en base al método estadístico Maximum Likelihood y distancias evolutivas con modelo Tamura-3.

3. RESULTADOS

3.1 Positividad de ADN de bacterias hemotróficas

La **Tabla 1** resume los resultados encontrados. En cuanto a la detección de ADN de *Borrelia* spp., no se encontró positividad en ninguna de las 358 muestras analizadas. Por el contrario, la detección de ADN de la familia *Anaplasmataceae* fue más exitosa al tener 121 muestras positivas de un total de 358 equivalente al 33.8% de positividad. *Anaplasmataceae* fue más prevalente en los perros provenientes de las localidades Las Peñas, Riviera del Napo, Rocafuerte y Yasuní con positivities de 57.1% (n=7), 54.9% (n=51), 54.8% (n=31) y 47.7% (n=44) respectivamente. Así mismo, las localidades con menor positividad de esta bacteria hemotrófica fueron Pesillo con 0% (n=29) y Nenkiguiro con 7.7% (n=13). En cuanto a la detección de ADN de *Mycoplasma* spp., la positividad general del estudio fue del 12.6% equivalente a 45 muestras positivas del total antes mencionado. Más específicamente, Guiyero tuvo la mayor positividad con un valor de 50% (n=8); sin embargo, otras localidades con alta positividad fueron Las Peñas con 42.9% (n=7), Rivera del Napo con 29.4% (n=51) y Rocafuerte con 22.6% (n=31). Por el contrario, las localidades Ganguetapare (n=4), Nenkiguiro (n=13) y TimpoKa (n=7) tuvieron 0% de positividad para *Mycoplasma* spp. En el caso de las muestras positivas para esta bacteria hemotrófica, el Anexo 1 indica que las temperaturas de melting observadas fueron 77.5 °C a 78°C.

En cuanto a la co-infección de bacterias hemotróficas, la Tabla 2 indica que a nivel general el 6.98% de muestras presentaron positividad para detección de ADN de tanto *Anaplasmataceae* como *Mycoplasma* spp. En este caso, las localidades Las Peñas, Rocafuerte y Riviera del Napo tuvieron coinfección en 2/7, 7/31 y 8/51 muestras respectivamente. Por el contrario, La Perla fue

la localidad con menor porcentaje de co-infección de *Anaplasmataceae* y *Mycoplasma* spp. refiriendo 1/116 individuos.

3.2 Alta diversidad de especies de *Anaplasmataceae* detectada mediante ONT

De las 45 muestras secuenciadas, 33 tuvieron lecturas de buena calidad (con Q score superior a 10) pero 2 muestras presentaron secuencias consenso con especies no pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae* por lo que no serán consideradas dentro del análisis. La comparación de las secuencias consenso con la base de datos GenBank del NCBI arrojó los resultados tabulados en el **Anexo 2**. Como resultado, se identificaron secuencias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Wolbachia* [**Tabla 3**]. Específicamente *Anaplasma platys* en los perros de Rivera del Napo, Las Peñas, Cristo Vive, La Perla y Rocafuerte [**Figura 3**], *Ehrlichia canis* en Riviera del Napo, Las Peñas, Cristo Vive, La Perla, Mindo y Rocafuerte [**Figura 4**] y *Wolbachia* endosimbionte de *Dirofilaria immitis* en Rocafuerte, Riviera del Napo, Las Peñas, Cristo Vive, La Perla y Mindo [**Figura 5**].

Analizando únicamente las muestras secuencias positivas para especies de la familia *Anaplasmataceae*, la co-infección más frecuente fue *Anaplasma platys* con *Ehrlichia canis* y *Wolbachia* endosimbionte de *Dirofilaria immitis* teniendo 11/33 muestras secuenciadas; de las cuales 6 pertenecieron a la localidad Rivera del Napo. Sin embargo, la segunda co-infección más común dentro del muestreo fue *Anaplasma platys* con *Ehrlichia canis* estando presente ADN de ambas bacterias en 4/33 muestras secuenciadas. Por el contrario, las coinfecciones menos comunes fueron *A. platys* o *E. canis* únicamente con *Wolbachia* endosimbionte de *Dirofilaria immitis* teniendo 0 y 1 casos respectivamente.

4. DISCUSIÓN

4.1 Alta positividad de *Anaplasmataceae* en zonas cálidas y húmedas

La positividad general de *Anaplasmataceae* alcanzó un 33.8% (121/358), con los valores más altos registrados en el Bosque Húmedo Tropical del Chocó (57.1%, 4/7), el Bosque Húmedo Tropical Amazónico (42.5%, 54/127) y el Matorral Seco de la Costa (54.8%, 17/31). Estas regiones, conocidas por sus climas cálidos con temperaturas promedio anuales de 24.5°C, presentan características específicas: mientras el Bosque Húmedo Tropical exhibe altos niveles de humedad con precipitaciones superiores a 2821 mm anuales, el Matorral Seco de la Costa destaca por su aridez en algunas áreas (Ron, 2020; Napo Wildlife Center, 2024). La alta positividad de *Anaplasmataceae* en perros de estas regiones se asocia con la distribución filogeográfica *R. sanguineus* sensu lato (linaje tropical) y *R. sanguineus* sensu stricto (linaje temperado). Zemtsova et al. (2017) señala que *R. sanguineus* s.l. predomina en territorios con temperaturas superiores a 20°C principalmente en Colombia, Brasil, Costa Rica y México. Tian et al. (2022) agrega que el desarrollo de *R. sanguineus* s.l. depende de la humedad relativa teniendo mayor eficiencia de conversión a 52% y 27 °C.

Por una parte, la alta competencia vectorial de *R. sanguineus* s.l. para transmitir *E. canis* fue comprobada por Moraes-Filho et al. (2015). Por otro lado, aunque no se dispone de datos nacionales oficiales, Boada Parra (2018) reportó 3.9% de prevalencia de garrapatas Ixodidae en 354 perros domésticos de Guayllabamba, en donde 14 estaban infestados por *R. sanguineus* s.l. Similarmente, en Guayaquil, Dávalos & Melchiade (2018) registraron 77.5% de ehrlichiosis y 25.17% de anaplasmosis en 120 perros callejeros, recolectando 604 garrapatas *R. sanguineus*. En países vecinos, McCown et al. (2015) reportaron positivities de *Anaplasmataceae* mayores al 75% en Barranquilla y Cartagena, mientras que la positividad en Medellín no superó el 25%. La

baja positividad en Medellín, ubicada a 1499 msnm con predominio urbano, se atribuye a la ausencia de factores ambientales favorables, similar a los hallazgos en el Páramo de 0% (0/29).

Las secuencias consenso de las muestras secuenciadas revelaron *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* y *Wolbachia* endosimbionte de *Dirofilaria immitis*; confirmando la eficacia del protocolo del Laboratorio de Bioinformática USFQ con ONT. Las co-infecciones de *A. platys* y *E. canis* en 12.1% (4/33) de muestras secuenciadas se explican debido por su transmisión compartida a través de *R. sanguineus* s.l. (Alhassan et al., 2021). Investigaciones previas reportan que perros con infecciones persistentes de *Anaplasma* o *Ehrlichia* son más propensos a infecciones secundarias y funcionar como reservorios. Esto podría explicar la elevada proporción de muestras (11/33) con *A. platys*, *E. canis* y *Wolbachia*, endosimbionte de *D. immitis*.

El hallazgo de *Wolbachia*, endosimbionte intracelular clave en la biología de filarias como *Dirofilaria immitis* y *D. repens*, sugiere la circulación activa de estos nematodos en la población estudiada. Kramer et al. (2018) destacan el rol de *Wolbachia* en la biosíntesis de moléculas esenciales para la supervivencia de sus hospederos, como hemo, purinas y pirimidinas. *D. immitis*, conocida como gusano adulto del corazón, es un nemátodo transmitido por mosquitos *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* causante de dirofilariasis cardiopulmonar canina. Esta enfermedad permanecer asintomática por años o evolucionar hacia síntomas graves como disnea, hipertensión pulmonar y fallo cardíaco (Badillo-Viloria et al., 2023). La presencia de *Wolbachia* respalda la circulación de *D. immitis* en la población estudiada, con prevalencia del 100% según estudios previos (Tabar et al., 2013). Incluso, McCown et al. (2015) reporta a vectores de este nemátodo en distintas áreas de Colombia y Ecuador, así como reportes explícitos de dirofilariosis en las Islas Galápagos y regiones amazónicas de Colombia, Perú y Brasil.

4.2 Ausencia de *Borrelia* spp.

La nula positividad de *Borrelia* spp. coincide con el estudio de Adams et al. (2016), que reportó ausencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en perros de Santa Cruz, Galápagos. Al encontrar resultados similares, McCown et al. (2011) explican que barreras ecológicas como el océano y la Cordillera de los Andes podrían limitar la circulación de *B. burgdorferi* en Manta y Guayaquil a pesar de tener condiciones climáticas favorables. De esta manera, la nula positividad de *Borrelia* spp. en el área muestreada puede deberse a factores similares. No obstante, existen indicios de casos tanto en perros como humanos en donde se ha descrito la detección de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* (Bailón et al., 2023; Carrillo, 2022).

4.3 Haemoplasma en 12.9% de perros domésticos muestreados

Jaramillo-Delgado et al. (2024) detectaron ADN de *Mycoplasma* spp. en el 13.9% (458/3300) de perros muestreados en Medellín, Colombia, una cifra comparable al 12.9% reportado en este estudio. Fernandes et al. (2021) reportaron una alta prevalencia de hemoplasmas en dos regiones de Brasil, detectando al menos una especie en el 58.5% (38/65) de las muestras de jabalíes y en el 59.1% (94/159) de las muestras de perros evaluadas. Sin embargo, la positividad puede variar considerablemente entre localidades. Por ejemplo, en Brasil, la municipalidad de Campo Grande tuvo una positividad de *M. haemocanis* de 8.2% (4/49), mientras que en Ribeirão Preto fue 1.9% (3/154) (Alves et al., 2014; Soares et al., 2016). Estas diferencias pueden atribuirse, en parte, a la diversidad de vectores asociados con algunas especies de *Mycoplasma* y a otros factores de transmisión, como agresiones o peleas entre caninos, así como la transmisión vertical (Huggins et al., 2023; Lashnits et al., 2019).

4.4 Riesgo para fauna silvestre y potencial zoonótico

El Bosque Húmedo Tropical del Chocó, un hotspot de biodiversidad global, ha perdido el 75% de su hábitat por deforestación y actividades agropecuarias (Vazquez et al., 2005; Ron, 2020). Esta degradación no solo amenaza especies como *Leopardus pardalis* (Apéndice I de CITES), sino que también incrementa el contacto entre fauna silvestre, ganado y animales domésticos, favoreciendo la propagación de enfermedades zoonóticas (Tirira & Boada, 2005). Especies silvestres como mapaches (*Procyon lotor*), coatíes (*Nasua nasua*) y nutrias (*Pteronura brasiliensis*) son nuevos hospedadores de *Ehrlichia canis* en zonas con alta densidad de perros (Cândido et al., 2023). En Brasil, primates como *Sapajus apella* han sido infectados con *E. canis* y *Anaplasma marginale*. Incluso, estudios en micoplasmas hemotróficos destacan prevalencias significativas en perros de caza, jabalíes (*Sus scrofa*), felinos (*Puma concolor*, *Leopardus pardalis*), marsupiales (*Didelphis albiventris*) e incluso delfines del Amazonas (*Inia geoffrensis* y *Inia boliviensis*) (Duarte-Benvenuto et al., 2022; Fernandes et al., 2021). Estos hallazgos destacan la relación entre ecosistemas perturbados y el surgimiento de enfermedades en la fauna.

El contacto humano-animal, promovido por actividades como la ganadería y la urbanización, aumenta el riesgo de transmisión zoonótica. *Anaplasma platys* ha infectado humanos expuestos a *R. sanguineus*, y *Ehrlichia canis* se ha reportado en casos de ehrlichiosis monocítica en Venezuela. Incluso, en Costa Rica se ha detectado ADN del patógeno en donadores de sangre (Perez et al., 2006; Bouza-Mora et al., 2017; Arraga-Alvarado et al., 2014). Los veterinarios, por su constante exposición a vectores y animales infectados, son una población de alto riesgo. Un caso notable es el reporte de *A. platys*, *Bartonella henselae* y *Candidatus M. haematoparvum* en una veterinaria expuesta a múltiples vectores y especies animales (Maggi et al., 2013). El cambio climático, la expansión de vectores y el mal manejo de mascotas están potenciando la dirofilariasis neumónica (*Dirofilaria* spp.) (Badillo-Viloria et al., 2023).

5. CONCLUSIONES

El estudio evidencia una elevada positividad de bacterias hemotróficas de la familia *Anaplasmataceae* en perros domésticos de diversas regiones naturales de Ecuador, destacando la influencia de factores ambientales como temperaturas cálidas y humedades relativas altas que favorecen la presencia de vectores, particularmente *R. sanguineus* s. l. Asimismo, la detección de *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* y *Wolbachia* endosimbionte de *Dirofilaria immitis* confirma la efectividad del protocolo de secuenciación empleado y subraya el riesgo potencial de coinfecciones. La ausencia de *Borrelia* spp. sugiere barreras ecológicas que limitan su propagación, aunque no excluye su posible circulación en el país. Finalmente, los hallazgos destacan la importancia de las interacciones entre ecosistemas perturbados, fauna silvestre y animales domésticos en la emergencia de enfermedades zoonóticas, señalando la necesidad de una vigilancia epidemiológica integrada para mitigar riesgos en humanos y la biodiversidad.

6. TABLAS

Tabla 1. Positividad de bacterias hemotróficas en muestras de sangre de caninos en distintas localidades de Ecuador.

Región natural	Provincia	Localidad	Número de muestras	Positividad*		
				<i>Anaplasmataceae</i>	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Mycoplasma</i> spp.
Bosque Piemontano Occidental	Santo Domingo de Tsáchilas	Cristo Vive	26	5 (19.2%)	0 (0%)	1 (3.8%)
		La Perla	116	35 (30.2%)	0 (0%)	3 (2.6%)
Bosque Montano Occidental	Pichincha	Mindo	21	6 (28.6%)	0 (0%)	4 (19%) **
Páramo	Imbabura	Pesillo	29	0 (0%)	0 (0%)	5 (17.2%)
Bosque Húmedo Tropical Amazónico	Orellana	Comunidades huaorani	32	5 (15.6%)	0 (0%)	4 (12.5%)
		Yasuní	44	21 (47.7%)	0 (0%)	2 (4.5%) **
	Napo	Riviera del Napo	51	28 (54.9%)	0 (0%)	15 (29.4%) **
Bosque Húmedo Tropical del Chocó	Esmeraldas	Las Peñas	7	4 (57.1%)	0 (0%)	3 (42.9%) **
Matorral Seco de la Costa	Manabí	Rocafuerte	31	17 (54.8%)	0 (0%)	7 (22.6%) **
Total			358	121 (33.8%)	0 (0%)	45 (12.6%)

*Número de muestras positivas (Porcentaje de positividad)

** Resultados obtenidos por otras estudiantes.

Tabla 2. Coinfecciones *Anaplasmataceae* y *Mycoplasma* spp. en muestras de sangre de caninos en distintas localidades de Ecuador.

Región natural	Provincia	Localidad	Proporción entre muestras con coinfección y total de muestras positivas
Bosque Piemontano Occidental	Santo Domingo de Tsáchilas	Cristo Vive	1/6 (16.7%)
		La Perla	1/38 (2.6%)
Bosque Montano Occidental	Pichincha	Mindo	2/10 (20%)
Bosque Húmedo Tropical Amazónico	Orellana	Comunidades huaorani	2/9 (22.2%)
		Yasuní	2/23 (8.7%)
	Napo	Riviera del Napo	8/43 (18.6%)
Bosque Húmedo Tropical del Chocó	Esmeraldas	Las Peñas	2/7 (28.6%)
Matorral Seco de la Costa	Manabí	Rocafuerte	7/24 (29.2%)
Total			25/166 (15.1%)

Tabla 3. Infecciones y co-infecciones de especies de la familia *Anaplasmataceae* en caninos en distintas localidades de Ecuador.

Región natural	Provincia	Localidad	Número de muestras con secuencias consenso	Solo <i>A. platys</i>	Solo <i>E. canis</i>	Solo <i>Wolbachia</i>	<i>A. platys</i> y <i>E. canis</i>	<i>A. platys</i> y <i>Wolbachia</i>	<i>E. canis</i> y <i>Wolbachia</i>	<i>A. platys</i>, <i>E. canis</i> y <i>Wolbachia</i>
Bosque Piemontano Occidental	Santo Domingo de Tsáchilas	Cristo Vive	3	0	0	0	2	0	0	1
		La Perla	5	2	0	0	0	0	1	1
Bosque Montano Occidental	Pichincha	Mindo	1	0	0	0	0	0	0	1
Bosque Húmedo Tropical Amazónico	Orellana	Comunidades huaorani	1	0	0	1	0	0	0	0
		Yasuní	1	0	0	0	0	0	0	0
		Riviera del Napo	6	0	0	0	0	0	0	6
Bosque Húmedo Tropical del Chocó	Esmeraldas	Las Peñas	4	1	0	0	1	0	0	1
Matorral Seco de la Costa	Manabí	Rocafuerte	12	5	0	5	1	0	0	1
Páramo	Imbabura	Pesillo	0	0	0	0	0	0	0	0
Total			33	8	0	6	4	0	1	11

7. FIGURAS

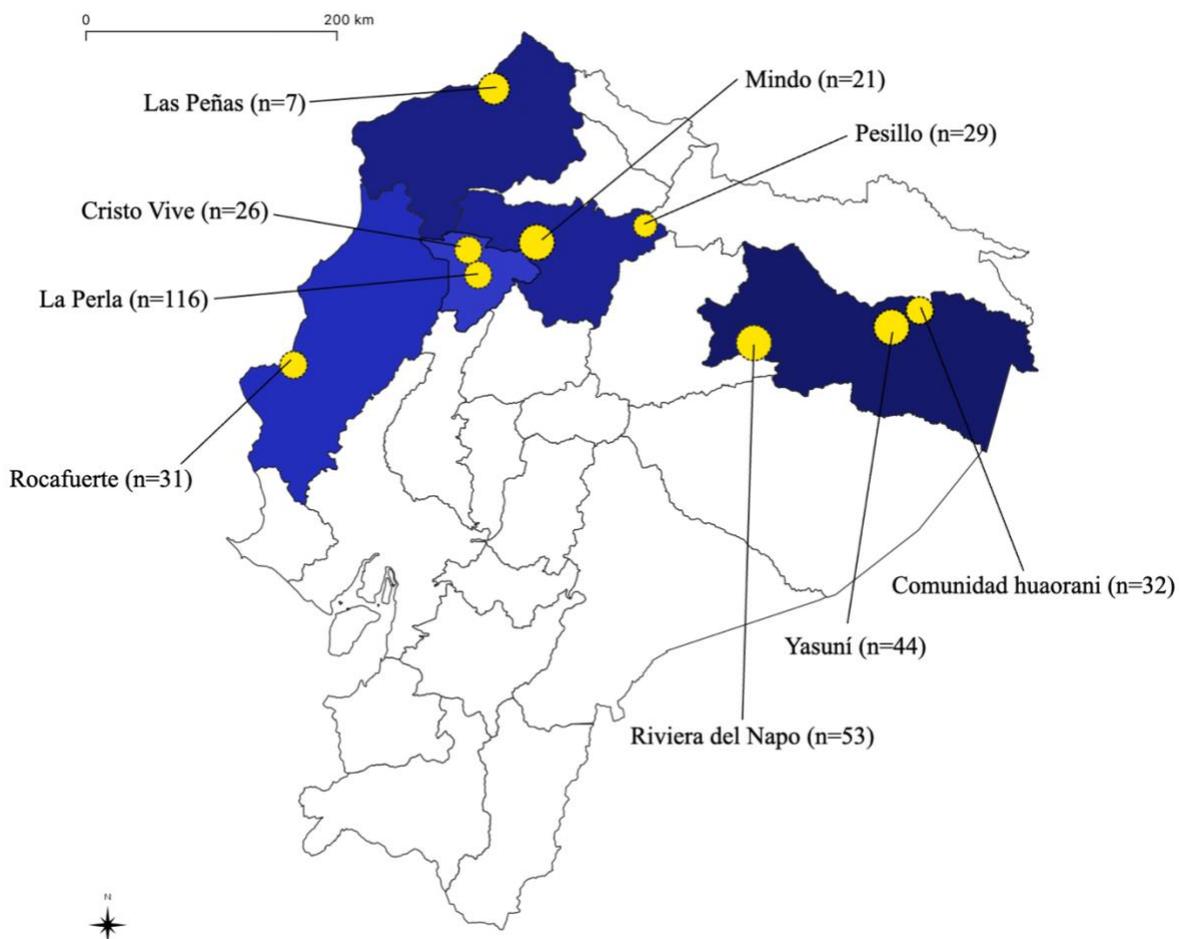


Figura 1. Localidades rurales muestreadas en el territorio ecuatoriano. Mapa con número de muestras por localidades rural del Ecuador en donde los círculos indican la zona de donde provienen las muestras junto al número de animales muestreados en cada localidad.

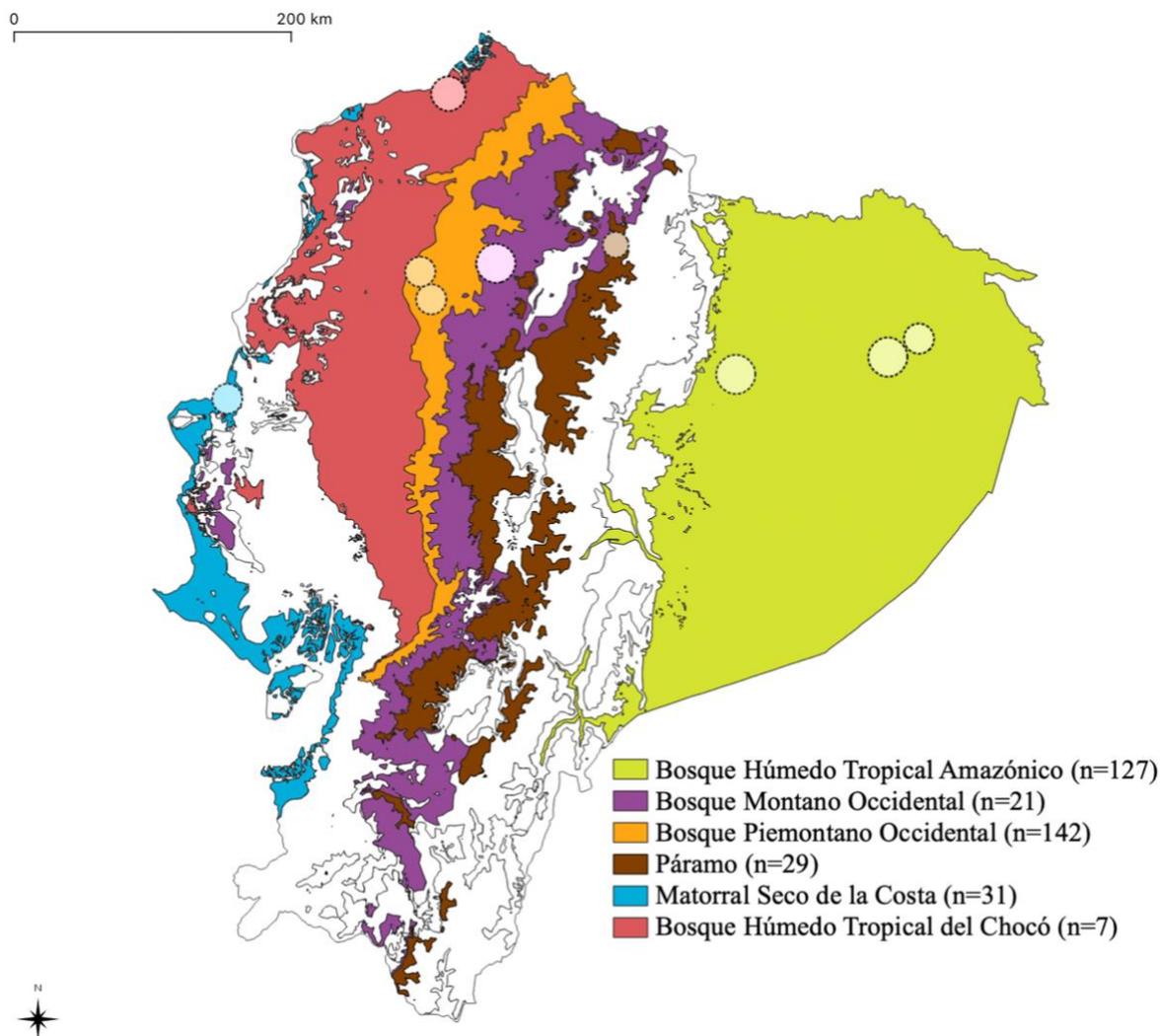


Figura 2. Regiones naturales con localidades rurales muestreadas en el territorio ecuatoriano. Mapa con número de muestras por región natural analizada en donde los colores indican regiones naturales distintas.

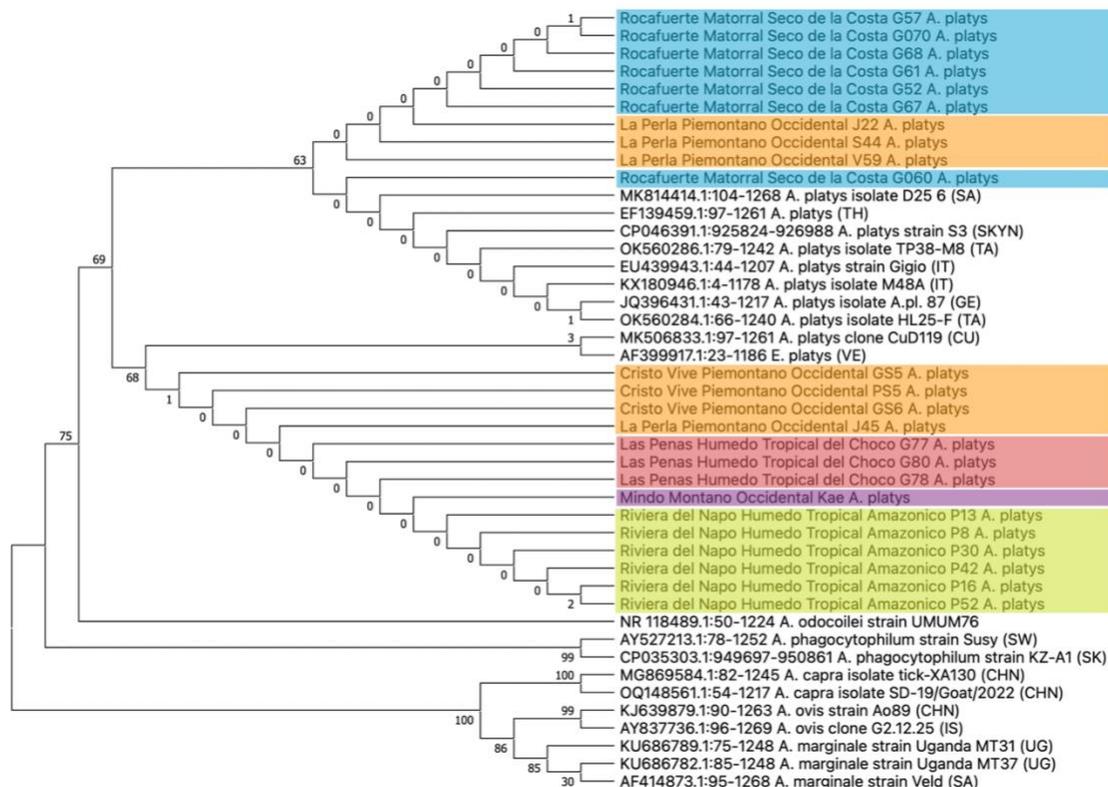


Figura 3. Árbol filogenético del género *Anaplasma* con método Maximum Likelihood. Las secuencias en color representan a las secuencias consenso del presente estudio bajo el código de Localidad_Región natural_Código de muestra_Especie identificada por BLASTn. Las secuencias monocromáticas corresponden a secuencias de referencia obtenidas del GenBank del NCBI bajo el código Número de accesoión_Especie identificada. 24 secuencias consenso fueron identificadas como *Anaplasma platys* debido al agrupamiento específico.

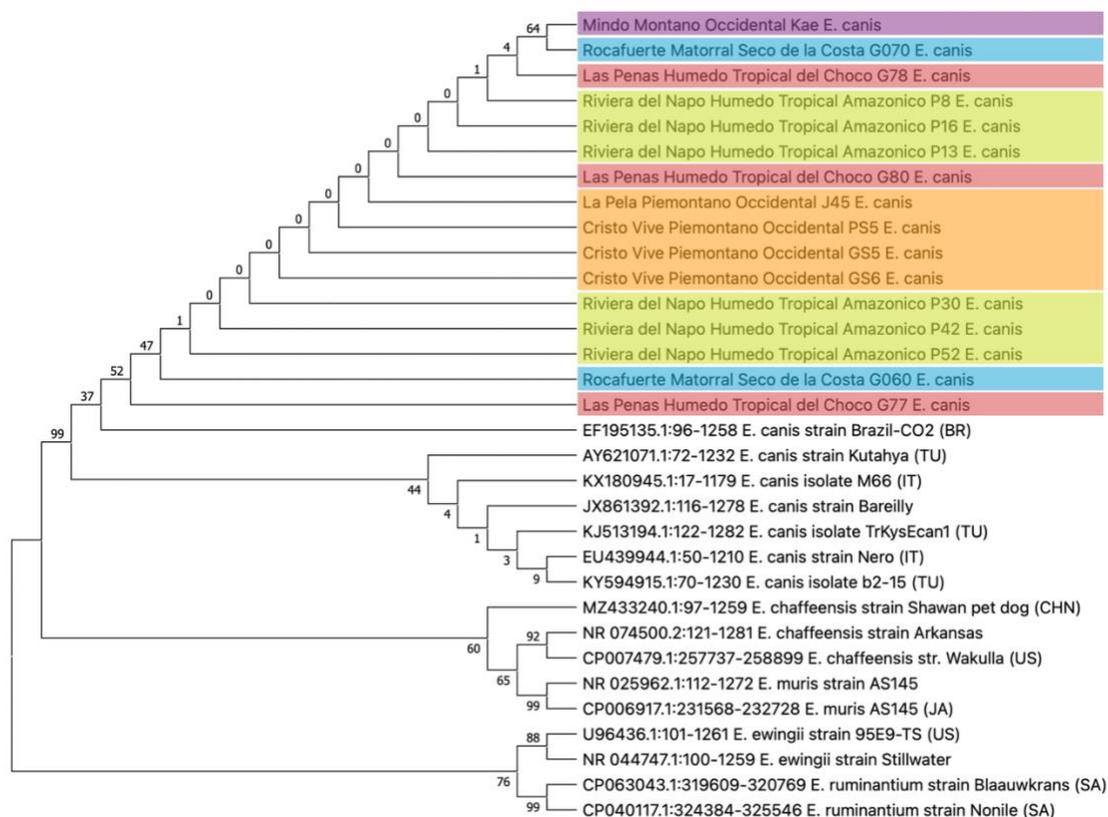


Figura 4. Árbol filogenético del género *Ehrlichia* con método Maximum Likelihood. Las secuencias en color representan a las secuencias consenso del presente estudio bajo el código de Localidad_Región natural_Código de muestra_Especie identificada por BLASTn. Las secuencias monocromáticas corresponden a secuencias de referencia obtenidas del GenBank del NCBI bajo el código Número de accesoión_Especie identificada. 16 secuencias consenso fueron identificadas como *Ehrlichia canis* debido al agrupamiento específico.

REFERENCIAS

- Adams, D. J., Rosenberg, D. E., & Yirui, H. (2016). Prevalence of vector-borne diseases in a sample of client-owned dogs on Santa Cruz in the Galápagos Islands: A pilot study. *Veterinary Parasitology (Amsterdam: Online)*, 6, 28–30.
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.11.007>
- Alhassan, A., Hove, P., Sharma, B., Matthew-Belmar, V., Karasek, I., Lanza-Perea, M., Werners, A. H., Wilkerson, M. J., & Ganta, R. R. (2021). Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the Caribbean. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(4), 101727.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101727>
- Alves, T. B., Faggion, S. A., Santos, E. V., Roberto, P. G., França, S. C., Fachin, A. L., & Marins, M. (2014). Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(2), 333–336.
<https://doi.org/10.4067/s0301-732x2014000200021>
- André, M. R. (2018). Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* agents in terrestrial wild carnivores worldwide: Implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 5 (22).
<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00293>
- André, M. R., Adania, C. H., Allegretti, S. M., & Machado, R. Z. (2011). Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42, 342–347.
<https://doi.org/10.1638/2010-0198.1>
- Arraga-Alvarado, C. M., Qurollo, B. A., Parra, O. C., Berrueta, M. A., Hegarty, B. C., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two

- Women from Venezuela. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(6), 1161–1165. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>
- Badillo-Viloria, M. A., García-Bocanegra, I., de Lavallo-Galvis, R. J., Martínez, R., de la Rosa-Jaramillo, S., Castillo-Castañeda, A., Ramírez, J. D., & Cano-Terriza, D. (2023). *Dirofilaria immitis* in pet dogs from the metropolitan area of the Colombian Caribbean. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 102(102064), 102064. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102064>
- Bailón, F., Vargas, M., Núñez, M., Torres, P. & Camacho, J. (2023). Enfermedad de Lyme en Paciente Masculino con Antecedentes De Microadenoma Hipofisiario y Síndrome de Kallman. Reporte de Caso. *Revista Multidisciplinar Ciencia Latina*, 7 (5). https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i5.8123
- Beus, K., Goudarztalejerdi, A., & Sazmand, A. (2024). Molecular detection and identification of hemotropic Mycoplasma species in dogs and their ectoparasites in Iran. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51173-w>
- Boada, D. (2018). *Determinación de la prevalencia y clasificación morfológica de garrapatas, mediante observación directa y examen clínico en caninos de la parroquia de Guayllabamba, Pichincha [Tesis de pregrado]*. Repositorio Digital de Universidad de las Américas. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/9066>
- Bonato, L., Figueiredo, M. A. P., Gonçalves, L. R., Machado, R. Z., & André, M. R. (2015). Occurrence and molecular characterization of Bartonella spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 42, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.09.001>

- Buysse, M., Koual, R., Binetruy, F., de Thoisy, B., Baudrimont, X., Garnier, S., Douine, M., Chevillon, C., Delsuc, F., Catzefflis, F., Bouchon, D., & Duron, O. (2024). Detection of Anaplasma and Ehrlichia bacteria in humans, wildlife, and ticks in the Amazon rainforest. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48459-y>
- Cadena, K. (2020). DINÁMICA EPIDEMIOLÓGICA DE MYCOPLASMA HEMOTRÓPICO EN CANINOS ATENDIDOS EN UNA CLÍNICA VETERINARIA DEL VALLE DE CUMBAYÁ EN ECUADOR [Tesis de pregrado]. Universidad de las Américas. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/12006/1/UDLA-EC-TMVZ-2020-10.pdf>
- Cândido, S. L., de Assis Pereira, N., de Oliveira Rosa Fonseca, M. J., de Campos Pacheco, R., Morgado, T. O., Colodel, E. M., Nakazato, L., Dutra, V., Vieira, T. S. W. J., & de Aguiar, D. M. (2023). Molecular detection and genetic characterization of Ehrlichia canis and Ehrlichia sp. in neotropical primates from Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(4), 102179. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102179>
- Cervantes S., M., Masgo C., D., Ramírez V., L., Álvarez M., G., Li E., O., Vásquez-Ydrogo., A., Gomez-Puerta, L. A., & Hoyos S., L. (2020). Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (Canis lupus familiaris) con ehrlichiosis en Chiclayo, Perú. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 31(2), e17820. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17820>
- Chalker, V. J. (2005). Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.10.002>
- CITES. 2000. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. En línea (15 mayo 2001). <http://www.wcmc.org.uk/CITES/cornmon>

- Conrado, F. de O., do Nascimento, N. C., dos Santos, A. P., Zimpel, C. K., Messick, J. B., & Biondo, A. W. (2015). Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos. *BMC Veterinary Research*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0601-8>
- Cook, M. (2014). Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *International Journal of General Medicine*, *1*.
<https://doi.org/10.2147/ijgm.s73791>
- Cubilla, M. P., Santos, L. C., de Moraes, W., Cubas, Z. S., Leutenegger, C. M., Estrada, M., Lindsay, L. L., Trindade, E. S., Franco, C. R. C., Vieira, R. F. C., Biondo, A. W., & Sykes, J. E. (2017). Microscopic and molecular identification of hemotropic mycoplasmas in South American coatis (*Nasua nasua*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *53*, 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.06.004>
- Dávalos, C. & Melchiade, J. (2018). Diagnóstico de ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariosis y enfermedad de Lyme y caracterización de vectores en caninos callejeros del sector Guasmo Sur – Guayaquil [Tesis de pregrado]. Universidad Central del Ecuador.
<https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2fd3f901-cd36-41eb-9bd3-c0528ee3f06f/content>
- du Breuil, R. M., Patel, J. M., & Mendelow, B. V. (1993). Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *Genome Research*, *3*(1), 57–59.
<https://doi.org/10.1101/gr.3.1.57>

- Duarte-Benvenuto, A., Sacristán, C., Ewbank, A. C., Sacristán, I., Zamana-Ramblas, R., Gravena, W., Mello, D. M. D., Ferreira da Silva, V. M., Marmontel, M., Carvalho, V. L., Marigo, J., & Catão-Dias, J. L. (2022). Hemotropic *Mycoplasma* spp. in Aquatic Mammals, Amazon Basin, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 28(12), 2556–2559. <https://doi.org/10.3201/eid2812.220971>
- Fernandes, A. J., Elshafie, N. O., Kmetiuk, L. B., Ullmann, L. S., Brandão, A. P. D., Haisi, A., Wilpe Bach, R., Barros-Filho, I. R., Araújo Junior, J. P., Barbosa, D. S., Biondo, A. W., & Santos, A. P. (2022). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in wild boars, hunting dogs, and hunters from two Brazilian regions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 908–912. <https://doi.org/10.1111/tbed.14038>
- Fernandes, A. J., Elshafie, N. O., Kmetiuk, L. B., Ullmann, L. S., Brandão, A. P. D., Haisi, A., Wilpe Bach, R., Barros-Filho, I. R., Araújo Junior, J. P., Barbosa, D. S., Biondo, A. W., & Santos, A. P. (2022). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in wild boars, hunting dogs, and hunters from two Brazilian regions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 908–912. <https://doi.org/10.1111/tbed.14038>
- Galluzzo, P., Grippi, F., Di Bella, S., Santangelo, F., Sciortino, S., Castiglia, A., Sciacca, C., Arnone, M., Alduina, R., & Chiarenza, G. (2020). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Stray Dogs from Southern Italy. *Microorganisms*, 8(11), 1688. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111688>
- Haynes, E., Garrett, K. B., Grunert, R. K. A., Bryan, J. A., II, Sidouin, M., Oaukou, P. T., Ngandolo, B. N. R., Yabsley, M. J., & Cleveland, C. A. (2024). Surveillance of tick-borne pathogens in domestic dogs from Chad, Africa. *BMC Veterinary Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04267-6>

- 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(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-37079-z>
- Jaramillo-Delgado, I. L., Ríos-Usuga, C., Arias, A., Gómez, D., Pérez, D., & Muñoz-Cadavid, C. (2023). Identificación molecular de microorganismos hemotrópicos transmitidos por vectores en caninos domésticos de diferentes centros veterinarios de Medellín, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 70(2).
<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v70n2.104573>
- Kramer, L., Crosara, S., Gnudi, G., Genchi, M., Mangia, C., Viglietti, A., & Quintavalla, C. (2018). Wolbachia, doxycycline and macrocyclic lactones: New prospects in the treatment of canine heartworm disease. *Veterinary Parasitology*, 254, 95–97.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.005>
- Lashnits, E., Grant, S., Thomas, B., Qurollo, B., & Breitschwerdt, E. B. (2019). Evidence for vertical transmission of *Mycoplasma haemocanis*, but not *Ehrlichia ewingii*, in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1747–1752.
<https://doi.org/10.1111/jvim.15517>
- Maggi, R. G., Mascarelli, P. E., Havenga, L. N., Naidoo, V., & Breitschwerdt, E. B. (2013). Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasites & Vectors*, 6(1).
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-103>
- Massini, P. F., Drozino, R. N., Otomura, F. H., Mongruel, A. C. B., Valente, J. D. M., Toledo, M. J. D. O., Martins, T. F., Vidotto, O., Vieira, T. S. W. J., & Vieira, R. F. D. C. (2019).

- Detection of Hemotropic Mycoplasma sp. in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Southern Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 2961, 797–801. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019058>
- McCown, M., Monterroso, V. & Cardona, W. (2015). Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10 (2).
<https://www.redalyc.org/pdf/3214/321443145015.pdf>
- Mccown, M., Monterroso, V. H., & Grzeszak, B. (2011). Zoonotic and infectious disease surveillance in Ecuador: *Ehrlichia Canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Dirofilaria immitis* prevalence rates in canines. *Journal of Special Operations Medicine: A Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 11(4), 61. <https://doi.org/10.55460/9u3u-bciz>
- Merino-Charrez, O., Badillo-Moreno, V., Loredó-Ostí, J., Barrios-García, H. & Carvajal-de-la-Fuente, V. (2021). Detección molecular de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* y alteraciones hematológicas de perros infectados. *Abanico veterinario*, 11. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322021000100119
- Ministerio de Ambiente del Ecuador (2018). Mapa de fragmentación de los ecosistemas de Ecuador continental. Quito, Ecuador. <http://mapainteractivo.ambiente.gob.ec/>. Descargado en enero de 2019.
- Moraes-Filho, J., Krawczak, F. S., Costa, F. B., Soares, J. F., & Labruna, M. B. (2015). Comparative evaluation of the vector competence of four south American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine

monocytic ehrlichiosis. *PloS One*, 10(9), e0139386.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139386>

Napo Wildlife Center. (2024). Weather and temperature at Yasuni National Park.

<https://napowildlifecenter.com/weather-and-temperature-at-yasuni-national-park/>

Organización Mundial de la Salud. (2023). *Una sola salud*. OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health>

Pérez-Macchi, S., Pedrozo, R., Bittencourt, P., & Müller, A. (2019). Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 62, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.015>

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>

Ron, S. R. (2020). Regiones naturales del Ecuador. BIOWEB. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/RegionesNaturales>

Rubio, A., Salas, E. & Gómez, G. (2011). Presencia de anticuerpos contra *borrelia burgdorferi* y *anaplasma sp* en canes de la ciudad de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22 (3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300008

Skar, G., Blum, M. & Simonsen, K. (2024). *Lyme Disease*. StatPearls.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431066/#:~:text=Lyme%20disease%20is%20divided%20into,fever%2C%20myalgia%2C%20and%20arthralgia.>

- Snellgrove, A. N., Krapiunaya, I., Ford, S. L., Stanley, H. M., Wickson, A. G., Hartzer, K. L., & Levin, M. L. (2020). Vector competence of *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* for *Anaplasma platys*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *11*(6), 101517.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101517>
- Soares, R. L., Echeverria, J. T., Pazzuti, G., Cleveland, H. P. K., Babo-Terra, V. J., Friozi, E., & Ramos, C. A. do N. (2016). Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria [Brazilian journal of veterinary parasitology]*, *25*(3), 360–363.
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612016043>
- Tabar, M. D., Altet, L., Martínez, V., & Roura, X. (2013). *Wolbachia*, filariae and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. *The Journal of Small Animal Practice*, *54*(4), 174–178. <https://doi.org/10.1111/jsap.12041>
- Thongsahuan, S., Chethanond, U., Wasiksiri, S., Saechan, V., Thongtako, W., & Musikacharoen, T. (2020). Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. *Veterinary World*, *13*(11), 2388–2394.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2388-2394>
- Tian, Y., Kaufman, P. E., Taylor, C. E., Beati, L., & Lord, C. C. (2022). Variable effects of temperature and relative humidity on *Rhipicephalus sanguineus* L. (Acari: Ixodidae) development. *Environmental Entomology*, *51*(4), 848–858.
<https://doi.org/10.1093/ee/nvac027>
- Tirira, D. & Boada, C. (2005). EVALUACIÓN ECOLÓGICA RÁPIDA DE LA MASTOFUNA EN LOS BOSQUES DEL SUROCCIDENTE DE LA PROVINCIA DE ESMERALDAS. En: Vázquez, M.A, J.F. Freire y L. Suárez (Eds.). 1 Biodiversidad en el

suroccidente de la provincia de Esmeraldas: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas. EcoCiencia y MAE Seco. Quito

<https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/18041-opac>

Vázquez, M.A, J.F. Freire y L. Suárez (Eds.). 2005. Biodiversidad en el suroccidente de la provincia de Esmeraldas: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas. EcoCiencia y MAE. Quito. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/18041-opac>

Vierstraete, A. R., & Braeckman, B. P. (2022). Amplicon_sorter: A tool for reference-free amplicon sorting based on sequence similarity and for building consensus sequences.

Ecology and Evolution, 12, e8603. <https://doi.org/10.1002/ece3.8603>

Zemtsova, G. E., Apanaskevich, D. A., Reeves, W. K., Hahn, M., Snellgrove, A., & Levin, M. L. (2016). Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and its relationships with climatic factors. *Experimental & Applied Acarology*, 69(2), 191–203.

<https://doi.org/10.1007/s10493-016-0035-4>

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de temperaturas de melting de muestras positivas para *Mycoplasma* spp.

Región natural	Provincia	Localidad	Muestra	Temperatura de melting (°C)
Bosque Húmedo Tropical Amazónico	Orellana	Comunidades huaorani	GI8	78-78.5
			GI2	77.5-78
			GI3	78.5
			GI4	78.5
Bosque Piemontano Occidental	Santo Domingo de Tsáchilas	La Perla	S22B	77
			V11	78-78.5
			J22	78
Páramo	Imbabura	Pesillo	P5	78.5
			P8C	78.5
			P9D	78.5
			P19D	78.5
			P30A	77.5

Anexo 2. Especies de bacterias hemotróficas identificadas mediante BLASTn

Provincia	Localidad	Código de muestras	Especie identificada por BLASTn	% identidad
Manabí	Rocafuerte	G070	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,83%
		G52	<i>Anaplasma platys</i>	100%
		G57	<i>Anaplasma platys</i>	100%
		G60	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
		G61	<i>Anaplasma platys</i>	100%
		G67	<i>Anaplasma platys</i>	100%
G68	<i>Anaplasma platys</i>	100%		
Esmeraldas	Las Peñas	G77	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
		G78	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
		G80	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
Santo Domingo de los Tsáchilas	Cristo Vive	GS5	<i>Anaplasma platys</i>	99,91%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
		GS6	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
	La Perla	PS5	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
		S44	<i>Anaplasma platys</i>	100%
		V59	<i>Anaplasma platys</i>	100%
Pichincha	Mindo	Kae	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
		P13	<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
			<i>Anaplasma platys</i>	99,91%
Orellana	Rivera del Napo	P16	<i>Ehrlichia canis</i>	99%
			<i>Anaplasma platys</i>	99,91%
		P30	<i>Anaplasma platys</i>	100%
			<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
P42	<i>Anaplasma platys</i>	100%		

	<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
P52	<i>Anaplasma platys</i>	100%
	<i>Ehrlichia canis</i>	99,91%
P8	<i>Ehrlichia canis</i>	99%
	<i>Anaplasma platys</i>	99,91%
