

**Determinación de genogrupos de *Ehrlichia canis* en pacientes con EMC diagnosticados en el
Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias,
Tropicales e infecciosas (CEDIMOL)**

Robinson Duvan Jaimes Ortega

Julio 2024



Nota del Autor

Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona, Pamplona- Norte de Santander.

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:

robinson.jaimes@unipamplona.edu.co

**Determinación de genogrupos de *Ehrlichia canis* en pacientes con EMC diagnosticados en el
Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias,
Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL)**

Trabajo de Grado como requisito para optar al título de Médico Veterinario

Director

Jesús Alberto Mendoza Ibarra DVM M. Sc.; Ph. D.

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona

Pamplona, Norte de Santander, Colombia

2024

Dedicatoria

A mis padres, Don Alfonso y Doña Omaira, mis hermanas y mis sobrinos, quienes me inspiran, me apoyan y me han tendido la mano a lo largo de estos años. Su respaldo, confianza y palabras de aliento

han ayudado en la consolidación de mi trayectoria académica.

A mis abuelos y a Nixon, quienes ya no están a mi lado y siempre recordaré con cariño, porque

de ellos aprendí cosas valiosas para la vida y mi profesión.

A Manchas, mi compañía canina en las labores de campo entre cultivos de café y caña.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por guiarme, a mis padres por su apoyo incondicional, en momentos de alegría, de prueba y de dificultad siempre han sido el bastión para seguir adelante, a mis hermanas y sobrinos, por quienes quiero un mejor futuro y lucho todos los días para ello.

A mis compas y con quienes tuve la oportunidad de compartir durante la carrera, valoro el apoyo, la ayuda, los cafecitos con pan, las charlas académicas y el estudio en grupo, además de las interminables conversaciones sobre cualquier cosa.

Agradezco a mis profesores, quienes con su conocimiento, dedicación y estudios han contribuido a mi formación como Médico Veterinario. A mi tutor DVM, M. Sc; Ph. D. Jesús Alberto Mendoza Ibarra por su disposición, tiempo y paciencia para compartir su conocimiento y ayudarme a enriquecer este proceso académico.

Agradezco a los miembros del Laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL), que estuvieron prestos a acompañarme y enseñarme durante mi pasantía, gracias por ese apoyo.

Tabla de contenido

Introducción	10
Descripción del sitio de pasantía	11
Actividades desarrolladas durante la pasantía	12
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo I	15
Planteamiento del problema	15
Justificación	16
Objetivos	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	18
Capítulo II	18
Introducción	18
Revisión bibliográfica	19
Etiología	19
Epidemiología	22
Fisiopatología	23
Diagnóstico	24
Hemograma	24
Visualización microscópica	24
Frotis de capa blanca	25
Cultivo	25
Serología	25

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
Colecta de la muestra.....	26
Lisis celular	26
Extracción	27
Cuantificación del ADN.....	27
PCR punto final y PCR en tiempo real	28
Electroforesis.....	29
Genotipificación	30
Secuenciación.....	30
Genotipos de <i>Ehrlichia canis</i>	31
Capítulo III	33
Metodología	33
Población de estudio	33
Recolección y conservación de las muestras	34
Lisis de glóbulos rojos.....	34
Extracción de ADN.....	34
Método fenol- cloroformo alcohol isoamílico	34
Método por kit o columna	35
Cuantificación de ADN.....	35
PCR punto final y PCR semi-anidada	35
Selección de primers	35
Posición de los primers	36
Desarrollo de la PCR	37
Electroforesis.....	38

Secuenciación.....	38
Capítulo IV	38
Resultados	38
Extracción de ADN.....	38
Cuantificación de ADN.....	38
Concentración	38
260/280	39
260/230	39
PCR punto final.....	40
PCR semi-anidada.....	40
Secuenciación.....	42
Discusión	43
Capítulo V	49
Conclusiones.....	49
Recomendaciones	49
Referencias bibliográficas.....	50
Anexos	59
Base de datos de los pacientes participantes	59

Lista de Tablas

Tabla 1 Primers TRP36 utilizados en PCR punto final	36
Tabla 2 Secuencia de primers utilizados en PCR semi-anidada	36
Tabla 3 Condiciones para la PCR punto final con los primers TRP36-F2 y TRP36-R1	37
Tabla 4 Condiciones para la PCR semi-anidada con los primers TRP36-DF y TRP36-R1	37
Tabla 5 Resultados de las muestras secuenciadas comparadas con en el GenBank	43

Lista de Figuras

Figura 1 Representación del genoma de <i>Ehrlichia canis</i>	20
Figura 2 Clasificación taxonómica de <i>Ehrlichia canis</i>	21
Figura 3 Pasos de un ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
Figura 4 Visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel.....	29
Figura 5 Secuenciación enzimática de Sanger	30
Figura 6 Representación esquemática de la posición de los primers TRP36.....	36
Figura 7 Cuantificación de concentración de ADN por espectrofotometría en NanoDrop	39
Figura 8 Electroforesis de PCR punto final de <i>Ehrlichia canis</i> con primers TRP36.....	40
Figura 9 Electroforesis de PCR semi-anidada de <i>Ehrlichia canis</i> con primer TRP36	41
Figura 10 Electroforesis de PCR semi-anidada de <i>Ehrlichia canis</i> con primers TRP36.....	41
Figura 11 Electroforesis de PCR semi-anidada de <i>Ehrlichia canis</i> con primers TRP36.....	41

Introducción

La Medicina Veterinaria es una amalgama de conocimientos que reúnen las ciencias agropecuarias y las biomédicas. En principio nace de la necesidad del hombre por cubrir diversas carencias, como la obtención del alimento, aunque actualmente su enfoque ha estado mudándose a diversos pilares como la sanidad animal, medicina preventiva, salud pública y la inocuidad alimentaria.

El actuar de los profesionales en medicina veterinaria tiende a ser diverso, debido a las aptitudes desarrolladas para este fin. Este profesional es el encargado de la sanidad animal que propende por prevenir, tratar y controlar las enfermedades que afectan a las especies de compañía, especies de producción y fauna silvestre. Además de optimizar recursos, administrar, ser agente objetivo en la vigilancia epidemiológica y mejorar las cadenas de valor de los productos de origen animal, mediante la seguridad, soberanía e inocuidad alimentaria. Por ello, es imperativo su actualización en temas que aborden métodos preventivos, diagnósticos e investigativos que permitan un enriquecimiento constante y por tanto, optimicen el actuar profesional, independientemente del área de interés.

Los pilares de la medicina veterinaria enmarcados en un contexto investigativo, permiten formar equipos interdisciplinarios para el estudio de enfermedades que afectan animales y seres humanos, esto debido a que la interacción entre estos, durante los periodos de convivencia, han marcado la co-evolución de ciertos microorganismos que afectan ambos hospederos, o sirven de reservorios en la transmisión de diversas enfermedades, lo cual ha llevado al principio de una sola salud o One Health, estrategia que permite un enfoque sanitario interdependiente y correlativo, mediante nuevos métodos de vigilancia y control de enfermedades, bien sea de forma local, regional o nacional.

El programa de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pamplona asume el compromiso de formar líderes, competentes, éticos e integrales comprometidos con los pilares del programa, mediante la formación teórico- práctica e investigación, marcado con un espíritu preventivista y sentido autocritico, que genere impacto en el desarrollo pecuario regional y nacional.

El presente escrito describe el trabajo realizado durante la pasantía de investigación llevada a cabo en el Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL). Institución interdisciplinar derivada de la pandemia de COVID-19, que ha enfocado también métodos diagnósticos con fines investigativos de enfermedades de interés veterinario, mediante estandarización de algunas técnicas, lo cual permite encaminar a futuro la prestación de servicios diagnósticos con pruebas de alto margen de especificidad y sensibilidad a diversas entidades, instituciones y civiles, generando impacto positivo en la región.

Descripción del sitio de pasantía

El Laboratorio Clínico del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas, es un laboratorio avalado por el Instituto Nacional de Salud (INS), creado dentro del contexto de la pandemia de COVID- 19 causada por el coronavirus SARS- CoV-2 en el año 2020. El objetivo primordial era prestar los servicios diagnósticos a la población para la detección del virus en la zona de influencia ante la emergencia sanitaria. Su funcionamiento comenzó en Cúcuta y porque otros núcleos poblacionales requirieron atención, se construyeron otras instalaciones en Pamplona, para dar una mejor cobertura a nivel departamental en Norte de Santander. Su ubicación en esta última ciudad se encuentra dentro del campus principal de la Universidad de Pamplona, en el segundo piso del edificio Eduardo Cote Lamus (EC).

En este laboratorio trabajan profesionales y estudiantes afines a las ciencias biomédicas. Bacteriología, Microbiología, Biología y Medicina Veterinaria son disciplinas que laboran mancomunadamente. La dirección de los distintos proyectos de investigación que se ejecutan en este centro de investigación está a cargo de los doctores Raúl Rodríguez Martínez, Diana Patricia Bohada, Reynaldo Gutiérrez Marín y Jesús Alberto Mendoza.

La infraestructura del laboratorio se conforma en dos espacios principales, el área limpia y el área sucia; en esta última está integrada por espacios como: área de toma y recepción de muestras, cabinas de desembalaje, extracción e inactivación de ácidos nucleicos, área de inmunofluorescencia, electroforesis, inmunología y microbiología. En el área limpia, en la cual se realizan los procedimientos de PCR, se distribuyen las áreas de máster mix, mezcla y amplificación de PCR. Dentro de la infraestructura del laboratorio también se cuentan con dos mesones donde se distribuyen algunos equipos y materiales, llevándose a cabo actividades que enriquecen el quehacer diario. Cuenta con oficinas, donde funciona como espacio administrativo y académico, y una sala de juntas para realizar discusiones, presentaciones, reuniones, trabajos teóricos, revisiones bibliográficas y análisis de resultados.

En el laboratorio se materializan proyectos de investigación que integran la estandarización de pruebas diagnósticas en diferentes enfermedades de interés en medicina humana y veterinaria, teniendo como foco de interés la zona de influencia en el departamento Norte de Santander, con miras a extender la zona de impacto, siempre con la premisa de servir como un agente integrador dentro de la vigilancia epidemiológica.

Actividades desarrolladas durante la pasantía

Las actividades de la pasantía se enmarcaron en diversos enfoques, como el conocimiento de los protocolos utilizados en CEDIMOL, incluyendo los estándares para el uso correcto de equipos, manejo de reactivos y material de trabajo, todos enmarcados en el del sistema integrado de gestión (SIG) para el laboratorio. Adicionalmente se realizó una introducción al área de bioinformática, el manejo de secuencias y el desarrollo de primers. Mientras que, a nivel de la praxis, las actividades incluyeron la identificación, recolección, transporte y almacenamiento de muestras, el conocimiento de los protocolos, extracción de ácidos nucleicos y, determinación de su pureza y concentración, además todos

los procesos relacionados con el desarrollo de la PCR de punto final y de tiempo real, el proceso de secuenciación y su interpretación para determinar los genogrupos de *E. canis*.

Asimismo, se ejecutaron actividades propias del laboratorio como preparación de reactivos, limpieza, desinfección y esterilización de materiales, manejo adecuado de residuos y muestras, colaboración e intervención en actividades propias del laboratorio, además de capacitaciones en uso de materiales, incluyendo la participación dentro del Semillero de Investigación de Enfermedades Infecciosas (SIDEIN) y, por último, análisis de datos, lectura, interpretación y escritura del informe final.

Resumen

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad transmitida por garrapatas que afecta a todos los cánidos, el agente etiológico es *Ehrlichia canis*, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, esta enfermedad multisistémica afecta a los caninos sin distinción de raza, sexo o edad, siendo de distribución mundial, es transmitida por el vector *Rhipicephalus sanguineus*, que pertenece a la familia *Ixodidae* que se encuentra en climas cálidos.

En este estudio, se seleccionaron 51 muestras de sangre correspondientes a pacientes positivos a EMC por inmunocromatografía, con edades comprendidas entre 1 mes y 10 años de vida, estas muestras fueron sometidas a extracción de ADN usando el método fenol- cloroformo y utilizando un kit comercial. Se desarrolló una PCR para el diagnóstico molecular con el gen 16S rRNA, los pacientes positivos, se sometieron a PCR punto final utilizando los primers TRP36-F2 y TRP36-R1, posteriormente, se utilizó una PCR semi-anidada utilizando los primers TRP36-F2 y TRP36-DF. Los amplificados fueron secuenciados mediante la técnica de Sanger para determinar variaciones en el gen *trp36* con el fin de caracterizar y genotipificar *E. canis* determinando las repeticiones en tándem. El análisis realizado determinó la presencia del genogrupo Estados Unidos (US) en 2 muestras y el genogrupo Costa Rica (CR)

en otras 2 muestras. Este trabajo es el primero que se realiza determinando los genogrupos de esta enfermedad de gran importancia en la población canina de la región debido a su alta prevalencia.

Palabras clave: *Ehrlichia*, primers, PCR, semi-anidada, TRP36, ADN, amplificación, secuenciación.

Abstract

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a tick-borne disease affecting all canids, the etiologic agent is *Ehrlichia canis*, belonging to the *Anaplasmataceae* family, this multisystemic disease affects canines regardless of breed, sex or age, and is distributed worldwide, it is transmitted by the vector *Rhipicephalus sanguineus*, which belongs to the *Ixodidae* family found in warm climates.

In this study, 51 blood samples corresponding to patients positive for CME by immunochromatography, aged between 1 month and 10 years of age, were selected. The DNA samples were extracted by the phenol-chloroform method and using a commercial kit. A PCR was developed for molecular diagnosis with the 16S rRNA gene, positive patients were subjected to an end-point PCR using the primers TRP36-F2 and TRP36-R1, then a hemi-nested PCR was used using the primers TRP36-F2 and TRP36-DF. The amplified samples were sequenced using the Sanger technique to determine variations in the *trp36* gene in order to characterize and genotype *E. canis* by determining the tandem repeats. The analysis determined the presence of the United States (US) genogroup in 2 samples and the Costa Rican (CR) genogroup in 2 other samples. This work is the first to determine the genogroups of this disease of great importance in the canine population of the region due to its high prevalence.

Key words: *Ehrlichia*, primers, PCR, heminested, TRP36, DNA, amplification, sequencing.

Capítulo I

Planteamiento del problema

La EMC Erlichiosis Monocítica Canina (EMC). Es una enfermedad multisistémica, de alta prevalencia en la población canina y con potencial zoonótico, causada por una bacteria intracelular de la familia *Anaplasmataceae*, que no tiene un factor predisponente para su presentación como predilección de edad, sexo o raza, con excepción de la presencia o infestación del vector biológico que transmite al agente etiológico, colocando en peligro los sistemas orgánicos del hospedero de manera diferente y en diversos grados de severidad (Munhoz et al., 2012). El agente etiológico es *Ehrlichia spp*, la cual es transmitida por diferentes vectores incluyendo garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis* y *Amblyomma americanum*. Las especies de *Ehrlichia* que puede estar involucradas son *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *E. canis*, siendo esta última la más prevalente en caninos (Gutiérrez et al., 2016), los monocitos y granulocitos son las principales células diana de estas bacterias (Procajto et al., 2011).

Las manifestaciones clínicas de la EMC son aguda, subclínica y crónica. En las tres fases se observan signos como fiebre, postración, esplenomegalia, anemia y trombocitopenia (Labruna & Machado, 2006), los cuales también se encuentran asociados a otras patologías y hacen difícil la identificación del agente por pruebas rutinarias sin las debidas ayudas diagnósticas de laboratorio. La fase aguda y subclínica no es muy específica, dado que convergen una gama de signos, como, depresión, letargo, anorexia, fiebre y pérdida de peso (Rojas-Triviño et al., 2013), aunque esto depende del estado inmunitario del hospedero, así como la concurrencia de infecciones secundarias o condiciones que favorezcan la inmunosupresión del paciente (Procajto et al., 2011). En la fase crónica siempre propenderá las manifestaciones hemorrágicas junto con un conjunto de signos que puede ser variado, obedeciendo a una pancitopenia generalizada (Gutiérrez et al., 2016).

Diversos autores han planteado que posiblemente existe una relación entre los diversos genotipos y las diferentes manifestaciones clínicas de la EMC. Esto coloca en tela de juicio que el hospedero y factores inherentes al mismo, sean los únicos que faciliten la presentación clínica, dado que en una triada epidemiológica, el agente etiológico, sus factores de virulencia y pequeños cambios filogenéticos pueden favorecer presentaciones clínicas más leves o severas. Para Mylonakis et al. (2010) la variación de la virulencia de las cepas de *E. canis* está relacionada con la gravedad de la enfermedad, lo que resulta concordante ya que se han encontrado cepas de este agente patógeno implicadas en formas mielosupresoras y no mielosupresoras de EMC (Siarkou et al., 2007).

La variación genética que puede manifestarse clínicamente en *E. canis* ha llevado al estudio de esas pequeñas modificaciones. De acuerdo con Ferreira et al. (2014) un paciente que fue infectado con una cepa, perteneciente a un clado, no presentó ningún signo clínico, mientras que otro canino que fue infectado con una muestra filogenéticamente variable, manifestó la signología clásica de la enfermedad. Con esto, se ha hipotetizado, que existen cepas que evolutivamente pueden estar más relacionados con episodios patogénicos de mayor severidad.

Justificación

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC), es una enfermedad emergente asociada principalmente a *E. canis* como agente etiológico, su distribución es cosmopolita debido a que el vector biológico (*Rhipicephalus sanguineus*) tiene capacidad de adaptación en entornos ecológicos cambiantes, o fácil asimilación a biósferas megadiversas como en el caso colombiano, por lo que se ha convertido en una problemática en la sanidad animal y la salud pública.

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad, se lleva a cabo por métodos que integran la anamnesis, el examen físico, hemograma, además del historial de contacto con el vector biológico y la observación en sangre periférica (Gutiérrez et al., 2016). Métodos indirectos como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), se considera el “gold standard” para la detección del agente

etiológico, aunque su sensibilidad y especificidad son cuestionables, debido a que métodos directos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrecen unos valores más cercanos a cien, lo cual permite realizar un acercamiento diagnóstico más preciso (Carrillo Bonilla et al., 2012).

El aumento de la prevalencia de la EMC en el país ha estado marcado por la variación de signos en las diversas fases de la enfermedad, estudios han demostrado que la presencia de casos diagnosticados se encuentra en todos los pisos térmicos del país, incluyendo zonas de trópico alto. Se ha establecido que la prevalencia ronda en 45.2% en Villavicencio y 59% en Bucaramanga (Vargas-Hernández et al., 2012), mientras que en Barranquilla es del 82% y en Cartagena del 79% (McCown, Alleman, et al., 2014). A pesar de la prevalencia, no se ha determinado las variaciones entre las diferentes cepas del agente etiológico. En Colombia dos estudios relacionados con la diversidad genética de *E. canis* se han realizado. En el área urbana de Medellín (Arroyave et al., 2020) y en el área urbana y rural del departamento del Cauca (Forero-Becerra et al., 2021), se determinó la circulación del agente etiológico con pruebas serológicas y de biología molecular y a partir de esta última, se establecieron las variaciones mediante la secuenciación de un área blanco, detectándose la presencia de tres genogrupos.

En Norte de Santander no se ha llevado a cabo ningún estudio de este tipo, por lo que resulta imperante conocer los genogrupos circulantes, para establecer las variaciones clínicas que se presenten, así como determinar el estado epidemiológico de la enfermedad a nivel molecular.

Objetivos

Objetivo General

Determinar los genogrupos de *Ehrlichia canis* en casos diagnosticados de EMC en el laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular, en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas.

Objetivos Específicos

Diagnosticar la presencia de *Ehrlichia canis* en muestras de sangre, mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Amplificar el gen *trp36* asociado a la diferenciación de los genogrupos de *Ehrlichia canis*, en las muestras seleccionadas para el estudio.

Secuenciar los amplificados para caracterizar las variaciones que permiten genotipificar y diferenciar los genogrupos de *Ehrlichia canis*.

Capítulo II**Introducción**

La EMC es una enfermedad infecciosa emergente, producida por bacterias del género *Ehrlichia spp*, la cual afecta a los miembros de la familia *Canidae*. Fue reportada por primera vez en 1935 por Donatien y Lestoquard, en el instituto Pasteur de Argelia, en perros febriles y con anemia, quienes en los monocitos se observaron unas inclusiones semejantes a rickettsias, pero no fue a mediados de siglo pasado donde tomó relevancia debido a brotes epizooticos en caninos militares ingleses en Singapur y en caninos militares de Estados Unidos en la guerra de Vietnam (Gutiérrez et al., 2016).

E. canis, *E. ewingii* y *E. chaffeensis* son los agentes asociados con el síndrome multisistémico que ocasiona estas bacterias intracelulares obligadas de pequeño tamaño, transmitida principalmente por garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus*. Las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes infectados son amplias, variadas y dependen de diversos factores, como la dosis del patógeno transmitido durante la alimentación del vector, la actividad del sistema inmunológico del hospedero, virulencia de la cepa infectante, coinfección con otros hemoparásitos; derivándose entonces malestar leve, febriles, asintomáticos y algunos fatales con múltiples manifestaciones hemorrágicas (Little, 2010).

Los métodos diagnósticos para la EMC se basan en anamnesis, epidemiología y examen físico, complementándose con hemoleucograma, frotis sanguíneos, inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y PCR. La sensibilidad y especificidad de cada prueba varía en relación a la fase de la enfermedad, el “gold standard” diagnóstico son pruebas indirectas como IFI y existen kits comerciales rápidos basados en la inmunocromatografía, como Snap Combo, SNAP® 3DX® (IDEXX laboratorios, Westbrook, ME, USA), SNAP® 4DX® PLUS (IDEXX laboratorios, Westbrook, ME, USA) que de hecho son los más utilizados en clínica, a pesar de que no presentan tanta especificidad y sensibilidad como el cultivo celular o la PCR (Procajlo et al., 2011).

Revisión bibliográfica

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC), afecta a los miembros de la familia *Canidae* que incluye a perros, lobos, coyotes y zorros, siendo predominante en los caninos domésticos *Canis lupus familiaris*. (Dumler et al., 2001; Gutiérrez et al., 2016; Marcondes, 2017). Es una enfermedad multisistémica grave denominada también como pancitopenia tropical canina, fiebre hemorrágica canina, rickettsiosis canina, tifus por garrapata canina y enfermedad del perro rastreador, esta enfermedad no presenta predilección por la edad, sexo o raza y pone en riesgo los sistemas orgánicos del hospedero en diversos grados de severidad (Gutiérrez et al., 2016).

Etiología

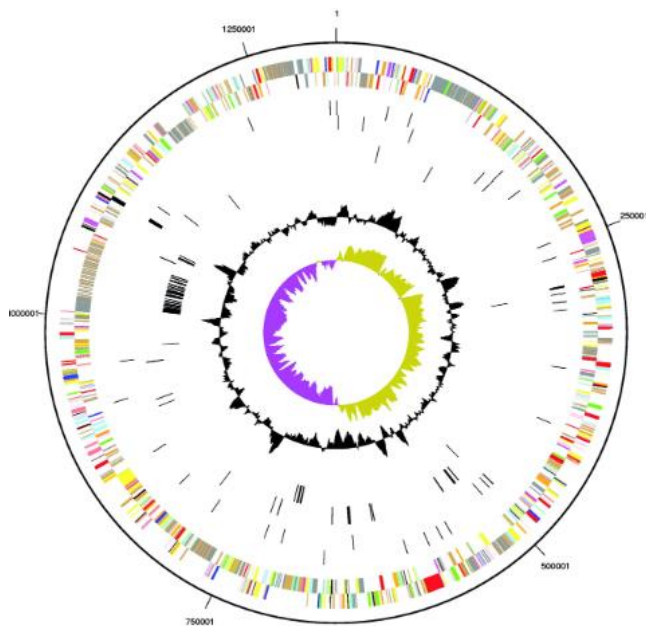
La Ehrlichiosis es un término para describir un grupo de enfermedades transmitidas por garrapatas causadas por bacterias intracelulares obligadas del género *Ehrlichia sp.* (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminantium*), que hacen parte de la familia *Anaplasmataceae*, un conjunto del orden Rickettsiales que afectan diversos mamíferos, incluyendo al humano (Dumler et al., 2001; Marcondes, 2017). Estas bacterias son Gram negativas, intracelulares obligadas, redondeadas o de forma cocoide de tamaño pequeño de 0.5 µm aproximadamente, su metabolismo es no glucolítico y su lipopolisacárido y peptidoglucano es escaso, pero presente (Vallejo- Forero, 2022), tienen tropismo por

las células hematopoyéticas de la línea mieloide, principalmente granulocitos y monocitos (Gutiérrez et al., 2016; Marcondes, 2017; Kumar et al., 2020) invadiendo el citoplasma de estas, establecen vacuolas, resultando posteriormente en la multiplicación por medio de fisión binaria, formando unas inclusiones denominadas mórulas, las cuales son algo pleomórficas y la densidad de apariencia puede variar según la etapa de replicación del microorganismo (Marcondes, 2017).

El genoma de *E. canis* consiste en un solo cromosoma circular compuesto de 1'315.030 nucleótidos, tiene 984 genes incluyendo una copia de cada uno de los genes de los ácidos ribonucleicos ribosomales (rRNA) 5S, 16S y 23S (Vallejo- Forero, 2022), de los nucleótidos se predice que codifica 925 proteínas, 40 especies de ARN estables, 17 pseudogenes putativos y una porción sustancial de secuencia no codificante que equivaldría a un 27% (Mavromatis et al., 2006). La representación del genoma se representa en la Figura 1.

Figura 1

Representación del genoma de Ehrlichia canis



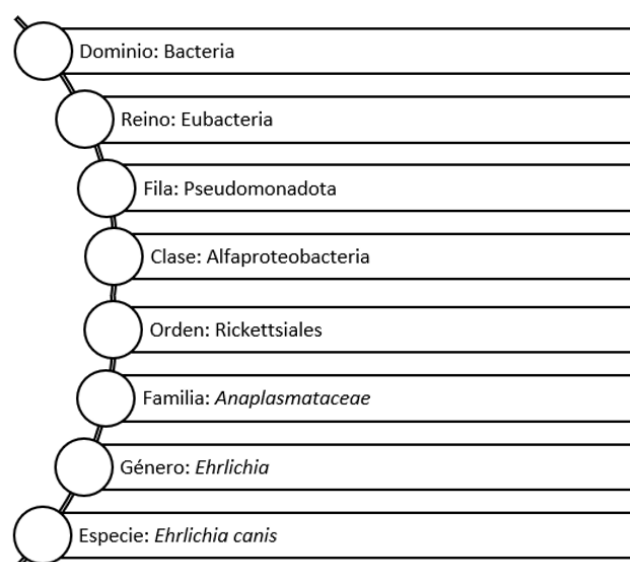
Nota. Adaptado de *Circular representation of the genome of E.canis* (Mavromatis et al., 2006).

La EMC es una enfermedad asociada a tres agentes etiológicos *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffeensis*, donde potencialmente se puede presentar coinfección con estos agentes y otros patógenos transmitidos por garrapatas (Gutiérrez et al., 2016). Una diferencia notable entre estos agentes etiológicos se puede basar en la especie del vector biológico o garrapata que los transmite, aunque principalmente se han diferenciado en relación al tipo de célula donde forman las vacuolas parasitóforas citoplasmáticas. Con esto, *E. ewingii* tiene afinidad por granulocitos siendo el agente etiológico de la Ehrlichiosis Granulocítica Canina y Humana, mientras que *E. chaffeensis* tiene tropismo por monocitos, a su vez que resulta siendo el agente etiológico de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (Dumler et al., 2001; Gutiérrez et al., 2016).

Ehrlichia canis es el agente de la EMC, la cual es la más prevalente en la población de cánidos (Procajto et al., 2011; Gutiérrez et al., 2016). La clasificación taxonómica del microorganismo puede observarse en la Figura 2.

Figura 2

Clasificación taxonómica de *Ehrlichia canis*



Nota. Adaptado de NCBI taxonomy, 2019

La historia natural de la enfermedad entra en un contexto donde fue identificada en el año 1935 por Donatien y Lestoquard del instituto Pasteur de Argelia, quienes visualizaron en monocitos de perros febriles y con anemia, organismos semejantes a rickettsias, a pesar de esto, la enfermedad no tomó relevancia (Gutiérrez et al., 2016). La investigación en este campo siguió un curso hasta mediados de los años 80, con la detección de la enfermedad en ciudadanos de Norteamérica, la cual era desconocida hasta el momento y era producida por un organismo íntimamente relacionado con *E. canis*. Este acontecimiento dio un nuevo impulso a la investigación sobre las enfermedades producidas por el género *Ehrlichia* (Harrus & Waner, 2011; Vallejo- Forero, 2022).

Epidemiología

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad de distribución mundial, endémica en los países subtropicales y tropicales. El agente etiológico necesita de un vector biológico para su transmisión. En Colombia, así como en gran parte del continente americano, las garrapatas del grupo *Rhipicephalus sanguineus* *s.l* son las involucradas, debido a su distribución y características que permiten la parasitación en los caninos (Vallejo- Forero, 2022).

Las garrapatas se encuentran divididas en dos familias, la *Ixodidae*, conocidas también como garrapatas duras por poseer una lámina dorsal dura; la familia *Argasidae*, conocidas como garrapatas blandas por carecer de lámina dorsal y una familia intermedia llamada *Nuttalliellidae*, representada por una única especie africana (Polanco & Ríos, 2016). Dentro de la transmisión de las especies de *Ehrlichia* (*E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*) en el canino, se han identificado varios géneros de garrapatas involucradas en la transmisión, todas pertenecientes a la familia de la lámina dorsal dura o *Ixodidae*, como anteriormente se mencionó, *Rhipicephalus sanguineus* es el principal vector asociado a la transmisión del agente etiológico, aunque *Amblyomma americanum* y *Dermacentor variabilis* han sido reportadas (Gutiérrez et al., 2016; Kumar et al., 2020). En Colombia, se encuentran descritas garrapatas

Ixodidae, como *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* y *Dermacentor nitens* (Ortíz-Valencia, 2005, citado en Guerrero, 2016).

Los estudios epidemiológicos realizados en Colombia con relación a la seroprevalencia y prevalencia de *E. canis* son escasos. El reporte de seroprevalencia promedia un 22% a nivel nacional, 22-24.8% en Medellín (Antioquia) (Cartagena Yarce et al., 2015), 49.5% en Cali (Valle del Cauca) (Silva-Molano et al., 2008), 67% en Bogotá D.C., 83.9% en Villavicencio (Meta), 89.7% en Bucaramanga (Santander) (Vargas-Hernández et al., 2012), 74- 83% en Barranquilla (Atlántico) y 80% en Cartagena (Bolívar) (McCown, Alleman, et al., 2014; McCown, Monterroso, et al., 2014).

Mediante técnicas moleculares, se ha informado prevalencia de 45.2% en Villavicencio (Meta) y 59% en Bucaramanga (Santander) (Vargas-Hernández et al., 2012).

Fisiopatología

La infección en el canino ocurre cuando las garrapatas infectadas ingieren sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio donde se alimenta (Procajto et al., 2011). *E. canis* ha desarrollado mecanismos que aseguran la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Los procesos de adhesión, internalización, proliferación, exocitosis y propagación intercelular del agente etiológico con la participación de diferentes vías de señalización culminan con la adquisición de nutrientes (Doyle et al., 2005), evasión lisosomal (Liu et al., 2011) y la inhibición de la apoptosis de la célula hospedero y su actividad mitocondrial (Rikihisa, 2006; Alves, Levenhagen, et al., 2014; Moumène & Meyer, 2016).

Una vez dentro en el hospedador, *E. canis* se disemina vía sanguínea y linfática dentro de las células mononucleares parasitadas, llegando a hígado, bazo, médula y ganglios linfáticos, donde continua su multiplicación (Procajto et al., 2011). La EMC tiene un periodo de incubación de 8 a 20 días y sus manifestaciones clínicas son aguda, subclínica y crónica (Mylonakis et al., 2010, citado en Gutiérrez et al., 2016).

La forma aguda de la EMC dura de dos a cuatro semanas, sus signos son inespecíficos, aunque caracterizados por aumento significativo de la temperatura corporal, debilidad general y apatía. Puede ir acompañado de pérdida progresiva de peso, alteraciones musculoesqueléticas, manifestaciones respiratorias como disnea, secreciones seropurulentas e incluso neumonía intersticial, es común la esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia y tendencia al sangrado (Procajto et al., 2011). La forma subclínica no presenta signos clínicos evidentes, pero dependiendo de la inmunocompetencia del individuo, puede progresar a la forma crónica (Gutiérrez et al., 2016).

La fase crónica de la enfermedad se caracteriza por signos característicos como emaciación severa, sangrados, melena o hematoquecia, hematomas y hematuria (Procajto et al., 2011), se presentan signos oculares derivados de la trombocitopenia severa como hemorragias retinales, hifema y petequias conjuntivales, son comunes los signos neurológicos, afecciones cardíacas, osteomusculares, principalmente poliartritis y renales como glomerulonefritis por nefropatía (Gutiérrez et al., 2016; Marcondes, 2017; Procajto et al., 2011).

Diagnóstico

Los métodos diagnósticos para *E. canis* son directos e indirectos, que varían en especificidad y sensibilidad. Dentro de estos, se cuenta con hemograma, visualización microscópica, frotis de capa blanca, cultivo, serología, que incluye inmunocromatografía y métodos moleculares.

Hemograma. Permite cuantificar y cualificar las células sanguíneas. En todas las etapas, la trombocitopenia es un hallazgo distintivo, acompañado de anemia y leucopenia. En fases crónicas es común la pancitopenia, debido a la aplasia de la médula ósea (Harrus & Waner, 2011).

Visualización microscópica. Mediante frotis sanguíneo y otras muestras biológicas permite la visualización de las mórulas, debido a que el género *Ehrlichia* infecta células hematopoyéticas observables microscópicamente por coloraciones tipo Romanowski (Diff- Quick o Hemacolor) como una

inclusión granular basófila en el citoplasma de monocitos (Allison & Little, 2013, citado en Gutiérrez et al., 2016).

Frotis de capa blanca. Se realiza centrifugando una muestra de sangre con EDTA en un capilar para hematocrito o en un tubo Wintrobe. A través de este método se agrupan los leucocitos y las plaquetas; con el concentrado resultante se realiza un frotis y se colorea. Las mórulas del agente etiológico se consiguen en las células diana. La búsqueda se hace con aceite de inmersión bajo microscopía (Gutiérrez et al., 2016).

Cultivo. Se utiliza una línea celular continua de macrófagos caninos (DH82) para cultivar *E. canis*. Esto ha abierto el camino hacia el desarrollo de la inmunofluorescencia indirecta para EMC en caninos. El aislamiento y crecimiento de este agente, se lleva a cabo en laboratorios de investigación, dado que requiere de equipos de laboratorio específicos y personal capacitado (Harrus & Waner, 2011).

Serología. Los métodos serológicos para el diagnóstico de EMC se consideran herramientas valiosas de detección y/o diagnóstico. La prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para anti- *E. canis* IgG se considera el “estándar de oro” serológico, dado que indica la exposición al agente infeccioso (Harrus & Waner, 2011). La desventaja de esta prueba IFI es que los anticuerpos detectados contra *E. canis* no son específicos, dado que hay reacciones cruzadas con *E. ewingii* y *E. chaffeensis* (Kelly, 2000, citado en Gutiérrez et al., 2016).

Además de la IFI, se han desarrollado ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) que han resultado útiles en el diagnóstico de la enfermedad (Harrus et al., 2002, citado en Harrus & Waner, 2011). Los kits Dot- ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *E. canis* están disponibles como pruebas rápidas, tales como rMAP2 ELISA, InDx Canine Multitest Dip-S-Ticks (PanBio, InDx), Snap Combo, SNAP® 3DX® (IDEXX laboratorios, Westbrook, ME, USA), SNAP® 4DX® PLUS (IDEXX laboratorios, Westbrook, ME, USA) (Gutiérrez et al., 2016; P. L. Martín, 2018).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se basa en la amplificación de fragmentos específicos de ADN bacteriano blanco, mediante un protocolo preestablecido. Los elementos importantes de la reacción son el molde (ADN), la Taq polimerasa, los primers, los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), Mg⁺, buffer y H₂O grado molecular (Innis et al., 1990; Tamay de Dios et al., 2013).

El ADN molde se obtiene de muestras o tejidos, la Taq polimerasa es una enzima termoestable que se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas que llevan el ADN de interés. Los primers son secuencias de oligonucleótidos que delimitan el blanco y se complementan con el mismo, están diseñados en dos sentidos, *Forward* (sentido) y *Reward* (anti-sentido), para que hibriden con el templado. Los dNTPS son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye nuevas cadenas de ADN, además que son los que contribuyen a la especificidad de la reacción (Innis et al., 1990; Tamay de Dios et al., 2013). El buffer es una solución amortiguadora compuesta de Tris- HCl (pH=8) que actúa como tampón para mantener el pH constante durante el proceso (Saiki et al., 1988). El Mg⁺ es un cofactor enzimático necesario para activar a la polimerasa y optimizar la unión de los primers al ADN diana, cuya concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM, aunque viene incluido en el buffer (Rychlik et al., 1990). El agua es el disolvente de la reacción, por lo que debe ser grado molecular y en su forma destilada, libre de nucleasas (Tamay de Dios et al., 2013).

Antes de iniciar con la PCR, deben seguirse una serie de pasos, para la preparación y procesamiento de la muestra.

Colecta de la muestra. Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener ADN íntegro y sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR (Alejos- Velázquez et al., 2014).

Lisis celular. En la lisis las interacciones entre las moléculas que conforman las membranas celulares se destruyen para que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes y caotrópicas que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para

inactivar las enzimas que degradan el ADN (Sambrook et al., 1989, citado en Alejos- Velázquez et al., 2014).

Extracción. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN basándose en las características fisicoquímicas de la molécula (Sandoval et al., 2013, citado en Alarcón, 2023). Los métodos que se utilizan son la extracción por fenol- cloroformo- alcohol isoamílico y la extracción por membranas de sílice (Alejos- Velázquez et al., 2014).

El Método de extracción fenol- cloroformo- alcohol isoamílico, se fundamenta en la lisis total de las estructuras subcelulares mediante el empleo la adición de soluciones de fenol y cloroformo, con la posterior precipitación de ADN mediado por el alcohol isoamílico (Sandoval, Martínez, et al., 2013).

El método de extracción por membrana de sílice o columna se basa en la purificación de ADN en columnas, mediante la lisis, unión, lavado y elución del material genético en soluciones detergentes, bufferadas y alcohólicas. Las soluciones de lavado y ciclos de centrifugación permiten la recuperación y unión a la matriz, que posteriormente se resuspende en solución amortiguadora (Alejos- Velázquez et al., 2014).

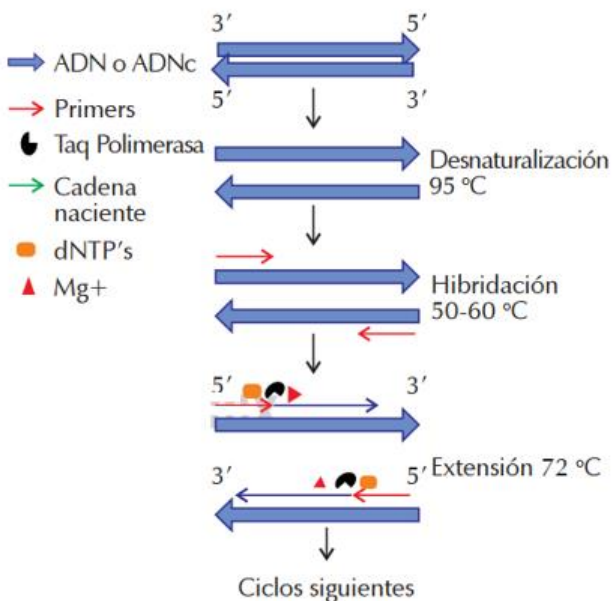
Cuantificación del ADN. Se realiza por espectrofotometría. El fundamento de esta es que cualquier solución que contenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene. Los nucleótidos de ADN y ARN presentan una absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm (luz ultravioleta, UV) (Sandoval, Martínez, et al., 2013). A partir de esto, se obtiene la cantidad dada en ng/μL, así como la proporción de absorbancia 260/280 y 260/230 que estima la pureza del ADN (Alejos- Velázquez et al., 2014).

La técnica de PCR se compone de tres pasos principales: desnaturalización, hibridación y elongación (Innis et al., 1990; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013) (Figura 3). En la desnaturalización, las muestras se someten a altas temperaturas para separar las hebras de ADN, en promedio el rango es de 94°C a 98°C en un lapso de no mayor a un minuto (Rychlik et al., 1990). Durante

la hibridación, la temperatura se reduce, para que los primers se unan específicamente a las regiones complementarias del ADN blanco, la temperatura utilizada varía en función a la composición de los primers y la longitud a hibridar, rondando de 50°C a 65°C (Rychlik et al., 1990). Finalmente, en la elongación, se aumenta la temperatura para permitir que la enzima Taq polimerasa extienda los primers y sintetice nuevas hebras de ADN. La temperatura óptima es de 72°C y la duración es variable dado que depende del fragmento que se está amplificando (Saiki et al., 1988).

Figura 3

Pasos de un ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



Nota. Se observa en la imagen los elementos importantes de la reacción, así como los pasos con sus respectivas temperaturas. Fuente (Tamay de Dios et al., 2013).

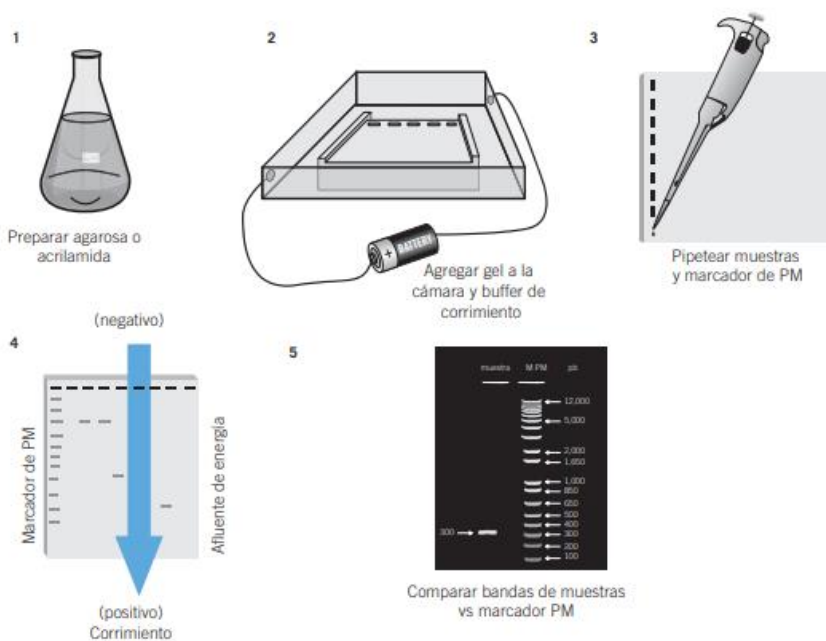
PCR punto final y PCR en tiempo real. La PCR en punto final y en tiempo real se diferencian en la forma de detección y cuantificación del producto amplificado. La PCR punto final, también denominada convencional, se compone de los tres pasos principales (desnaturalización, hibridación y elongación) donde la detección del producto amplificado se da mediante electroforesis en gel de agarosa (Mullis, 1990). La PCR en tiempo real cambia en el método de detección del producto amplificado y su

temporalidad, debido que la detección de las copias del producto de PCR se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación, mediante intercalados en el producto de PCR, un láser detecta fluorocromos acoplados a los primers o a una sonda que hibrida en medio de estos, que se degrada y se libera su fluorocromo por la acción de la exonucleasa 3'-5' de la polimerasa (Sandoval, Floresvillar, et al., 2013).

Electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa permite separar los fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una tinción sencilla, para determinar el contenido de los ácidos nucleicos de una muestra de una PCR punto final (Figura 4). El fundamento de la electroforesis es que, al someterse a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN harán que estos se muevan en dirección al ánodo, al forzarse a moverse en una estructura tridimensional, la fricción hace que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras que las de mayor tamaño avanzan más en el (Fierro, 2014).

Figura 4

Visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel



Nota. Se observan los pasos consecutivos para realizar la electroforesis. Fuente: (Sandoval, Floresvillar, et al., 2013).

Genotipificación

Secuenciación. La secuenciación tiene dos técnicas, el método de modificación y escisión química ideado por Allan Maxam y Walter Gilbert y el método de secuenciación por síntesis diseñado por Frederick Sanger, siendo este último el más implementado (J. M. V. Martín et al., 2020).

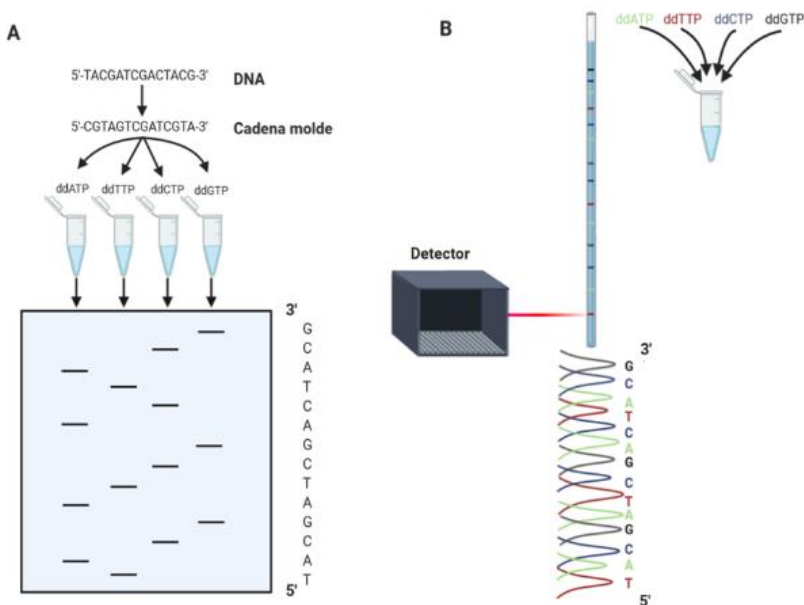
El método de Sanger se fundamenta en la secuenciación por síntesis, basado en la replicación de una molécula de ADN por la ADN polimerasa en presencia de nucleótidos modificados, didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que carecen del hidroxilo (OH) en el carbono 3' de la ribosa, que impiden la introducción del siguiente desoxinucleótidos (dNTPs) (Sanger & Coulson, 1975).

En este protocolo se prepara una mezcla de reacción que contiene el ADN molde de cadena sencilla, un primer, la ADN polimerasa y los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) con uno marcado por un fluorocromo. Esta mezcla se divide en cuatro reacciones y a cada una se agrega uno de los ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP), estos últimos, serán los encargados de detener la extensión de la cadena que es extendida por la ADN polimerasa, generando fragmentos de ADN acotados en el extremo 5' por el primer y en el extremo 3' por el ddNTP (Sanger et al., 1977; J. M. V. Martín et al., 2020).

Actualmente, se usan fluorocromos que, al ser excitados a cierta longitud de onda, emiten una luz previamente determinada. Para cada tipo de ddNTPs se asocia un fluorocromo que emite una luz a una longitud de onda diferente, lo que permite diferenciar cada base nitrogenada en una misma reacción. El revelado de la secuencia se realiza por electroforesis capilar de manera automática (J. M. V. Martín et al., 2020).

Figura 5

Secuenciación enzimática de Sanger



Nota. A) las reacciones del método de Sanger se llevan a cabo por separado. Cada reacción cuenta con un didesoxinucleótido trifosfato marcado que actúa como terminador de la reacción. Las reacciones se resuelven en gel de poliacrilamida y por autorradiografía se pueden observar los fragmentos de ADN. B) esquema del método de Sanger usado en la actualidad utilizando ddNTPs marcados con fluorocromos y el uso de la electroforesis capilar. Fuente: (J. M. V. Martín et al., 2020).

Genotipos de *Ehrlichia canis*. La genotipificación es el proceso para determinar las diferencias en la composición genética de un individuo mediante un análisis de su secuencia de ADN, comparándola con una de referencia. Dentro del genoma de *E. canis*, se ha identificado un pequeño grupo de proteínas que contienen repeticiones ácidas en tándem y anquirinas asociadas a interacciones hospedero-patógeno (Zhang et al., 2008), que permiten una comprensión de la diversidad genética del agente etiológico debido a su variabilidad (Mavromatis et al., 2006).

La caracterización molecular de *E. canis* se ha logrado utilizando genes altamente conservados como el 16S rRNA, el disulfuro oxidoreductasa (*dsb*) y otras secuencias de genes de proteínas inmunorreactivas, incluida la familia OMP-1 (p28/30) (Arroyave et al., 2020), sin embargo, estos genes proporcionan poca información sobre las diferencias moleculares entre las cepas de *E. canis* (Aguar

et al., 2013). Diversos autores han demostrado que el gen *trp36* provee más información sobre la diversidad genética de *E. canis* y puede utilizarse para genotipificar las cepas de este agente etiológico basándose en secuencias de repetición en tándem de aminoácidos (Zhang et al., 2008; Aguiar et al., 2013; Arroyave et al., 2020).

Los cuatro genogrupos identificados se caracterizan por la variación de secuencia de aminoácidos, para el genogrupo de Estados Unidos (US) se identifica por la secuencia TEDSVSAPA de 10 a 19 repeticiones (Doyle et al., 2005), el genogrupo Brasil (BR) con repeticiones variables de la secuencia ASVVPEAE (Aguiar et al., 2013), el genogrupo Taiwán (TWN) se asocia por la secuencia TEDSVSAPA, pero a diferencia de US, tiene variación importante en la región previa a la repetición conocida como pretándem (Hsieh et al., 2010) y el genogrupo Costa Rica (CR) presenta la secuencia EASVVPAEAPQPAQQTEDEFFSDGIEA, que también puede presentar variación en el último aminoácido que puede ser E, en la región TR de 2 a 7 repeticiones (Bouza-Mora et al., 2017).

En Cuba, en el año 2022, se llevó a cabo la recolección de muestras de sangre de ocho caninos que estaban infestados con *R. sanguineus* y que presentaban signos de EMC. Extrajeran ADN total de las muestras y amplificaron mediante PCR para analizarlas. Los resultados que se produjeron derivaron en que cuatro secuencias de *trp36* obtenidas no pertenecen a un clado de los genogrupos anteriormente descritos, lo que representó un nuevo genogrupo denominado como Cuba (CUB), el cual en los pacientes presentó frecuentes lesiones hemorrágicas (Navarrete et al., 2022).

Gracias a este gen, se han caracterizado la distribución de los genogrupos a nivel mundial. Estados Unidos (US), se ha identificado en América del Norte, Brasil, Nigeria, Camerún, España, Turquía e Israel. El genogrupo Taiwán (TWN) descrito en Sudáfrica, Tailandia, Turquía, Taiwán y Australia (Neave et al., 2022). El genogrupo Brasil (BR) determinado en Turquía y en las regiones norte, sur y oeste de Brasil, el genogrupo Costa Rica (CR), referido en Perú y en Costa Rica en muestras de sangre de humanos

(Arroyave et al., 2020) y el genogrupo Cuba (CUB) establecido solamente en este país (Navarrete et al., 2022).

En Colombia, la caracterización molecular de los genogrupos de *E. canis* que circulan se ha realizado en Medellín y en el Cauca, el primero se realizó con población total de 300 cánidos, quienes presentaron signos asociables a EMC, primeramente, se diagnosticó molecularmente Ehrlichiosis mediante 16S rRNA y *dsb*, el cual amplificó en 53 (18%) muestras del total, el gen completo y parcial de *trp36* se amplificó y secuenció sólo en el 66% (35/53) muestras positivas. El análisis filogenético de este gen determinó que en Medellín circulan tres genogrupos, Estados Unidos (US) en 21 perros, Costa Rica (CR) en 11 perros y Brasil (BR) en 3 perros (Arroyave et al., 2020). En el segundo estudio amplificaron muestras mediante PCR dirigida al gen 16 s rRNA y a partir de los amplicones se seleccionaron 16 muestras para determinar el genotipo de *E. canis* amplificando el gen *trp36*, encontrándose tres genotipos diferentes, Estados Unidos (US) en 9 muestras, Brasil (BR) en 1 muestra y Costa Rica (CR) en 6 muestras (Forero-Becerra et al., 2021).

Capítulo III

Metodología

Población de estudio

Inicialmente se diagnosticaron 51 caninos con signos clínicos compatibles y test diagnóstico positivo de EMC, provenientes de clínicas veterinarias de la ciudad de Cúcuta y Pamplona, Norte de Santander, comprendido desde febrero de 2023 a junio de 2024. Las edades de los animales oscilaron entre 1 mes y 19 días a 10 años, sin distinción de sexo ni raza. (Anexo 1).

Recolección y conservación de las muestras

La obtención de las muestras de sangre se realizó mediante la venopunción en la vena cefálica y/o yugular, previa antisepsia en la zona con alcohol al 70%. Se utilizó aguja hipodérmica y se recolectó un volumen de 3 a 6 mL, se emplearon tubos tapa lila con EDTA y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Lisis de glóbulos rojos

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 4500 rpm por diez minutos para separar la capa de leucocitos del resto de componentes. El *buffy coat* fue trasferido a tubos Eppendorf. Posteriormente se procedió a ejecutar la lisis de los glóbulos rojos, utilizando buffer de lisis (NH₄CL, EDTA y NaHCO₃) en proporción 1:3 al volumen colectado, obteniendo un pellet libre de eritrocitos. Finalmente, este se resuspendió en 100 µL de fosfato buffer salino (PBS) y se almacenó a -20°C.

Extracción de ADN

Método fenol- cloroformo alcohol isoamílico. Al pellet de glóbulos blanco-obtenidos se le agregó 500 µL de fenol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 6 minutos, la fase acuosa se transfirió a otro tubo Eppendorf, a este, se le adicionó 500 µL de fenol- cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 6 minutos. Se traspasó la fase acuosa a otro tubo y se adicionó 500 µL de cloroformo, se mezcló por inversión, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf.

Por último, se agregaron 500 µL de etanol absoluto y 20 µL de acetato de sodio 3M. Se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 10 minutos, se descartó el contenido del tubo. Al ADN precipitado se le adicionó 500 µL de etanol al 70% y se llevó a una centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos. Los tubos se dispusieron boca abajo para la evaporación del remanente de alcohol, durante un tiempo estimado de 2 a 3 horas. Finalmente, se incorporó a cada tubo 100 µL de buffer de elución del High Pure PCR Template Preparation kit (Roche®). Las muestras se conservaron a -20°C para su uso.

Método por kit o columna. Se realizó con el kit de extracción de Invitek®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente: se tomaron 200 µL de muestra, a la cual se le agregaron 220 µL de buffer de lisis y 20 µL de proteinasa K, posteriormente se incubaron a 65°C por 10 minutos y seguidamente a 95°C por 10 minutos. Se adicionó 260 µL de solución de binding y se mezcló con vortex, incubando a 5 minutos. Se transfirió la muestra a una columna, se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos, se descartó el tubo colector y nuevamente se adicionó la columna a un nuevo tubo. A continuación, se añadieron 600 µL de buffer de lavado HLT y se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos, descartando el tubo colector y transfiriendo la columna a un nuevo tubo. Posteriormente, se incorporaron 700 µL de buffer de lavado y se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos, desechando el tubo receptor, disponiendo la columna en un tubo nuevo, este paso se repitió una vez más. Continuadamente se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos para eliminar los restos de etanol, se descartó el tubo colector, transfiriendo la columna a un tubo Eppendorf. Seguidamente se precalentó el buffer de elución a 65°C durante 3 minutos y se adicionó 100 µL de este, dejándose incubar a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos. Por último, se descartó la columna y se almacenó el material genético a -20°C.

Cuantificación de ADN

Se ejecutó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® Lite Plus (Thermo Fisher Scientific, USA), la concentración se determinó con la absorbancia a 260 nm, la calidad de las muestras se midió mediante la relación 260/280 para establecer la presencia de proteínas y la relación 260/230 para contaminantes de origen químico. La cantidad utilizada fue de 2 µL por muestra y la limpieza del equipo se llevó a cabo con las recomendaciones del fabricante, utilizando agua grado molecular y papel óptico.

PCR punto final y PCR semi-anidada

Selección de primers. Para este estudio se utilizaron los primers sugeridos por Aguiar et al (2013), quienes utilizaron los primers universales TRP36- F2 y TRP36- R1 para la amplificación del gen *trp36* en una PCR punto final (Tabla 1.), siguiendo las condiciones descritas por Bouza-Mora et al (2017).

Seguidamente se utilizaron los primers sugeridos por Arroyave et al (2020) TRP36- R1 y TRP36- DF, en una PCR semi- anidada o *hemi-nested* con los amplificadores obtenidos en la PCR punto final para obtener todo el gen *trp36* siguiendo las condiciones propuestas por Bouza-Mora et al (2017). Una vez determinado se pudo obtener un amplificado de 800-1000pb (Tabla 2.) (Aguiar et al., 2014).

Tabla 1

Primers TRP36 utilizados en PCR punto final

Microorganismo	Nombre del primer	Secuencia	Longitud # de bases	Posición	Tamaño del producto	Referencia
<i>Ehrlichia canis</i>	TRP36- F2	5'- TTAAAAACAAAATTAACACACTA- 3'	23	167837-167859		(Aguiar et al., 2013)
	TRP36- R1	5'- AAGATTAACCTAATACTCAATATTACT- 3'	27	168699-168673	800-1000pb	(Aguiar et al., 2013)

Nota. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2

Secuencia de primers utilizados en PCR semi-anidada

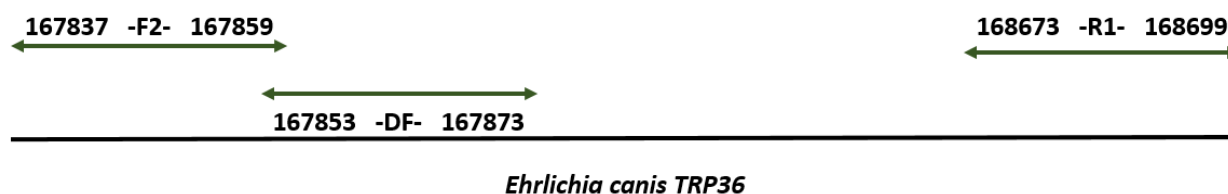
Microorganismo	Nombre del primer	Secuencia	Longitud # de bases	Posición	Tamaño del producto	Referencia
<i>Ehrlichia canis</i>	TRP36-DF	5'- CACACTAAAATGTATAATAAAGC- 3'	23	167853-167873		(Arroyave et al., 2020)
	TRP36- R1	5'- AAGATTAACCTAATACTCAATATTACT- 3'	27	168699-168673	800-1000pb	(Arroyave et al., 2020)

Nota. Fuente: Elaboración propia.

Posición de los primers. La posición de estos corresponde al gen *trp36*, que sintetiza la proteína inmunorreactiva TRP36 (Arroyave et al., 2020).

Figura 6

Representación esquemática de la posición de los primers TRP36



Nota. Fuente: Elaboración propia.

Desarrollo de la PCR. Esta consistió en un protocolo de PCR punto final y PCR semi- anidada descrito por Aguiar et al (2014), basándose en dos reacciones. La primera utilizando los primers Forward TRP36- F2 y Reverse TRP-36 R1. Las cantidades utilizadas fueron: 12,5 µL de OneTaq® Máster mix (BioLabs), 3 µL de primer TRP36- F2 y 3 µL de primer TRP36- R1, cada uno con una concentración de 10pmol, 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 4 µL de ADN molde, para un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones utilizadas en PCR se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3

Condiciones para la PCR punto final con los primers TRP36- F2 y TRP36- R1

Fase	Temperatura (°C)	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización final	95	30 segundos	35 ciclos
Alineamiento	52	30 segundos	
Extensión inicial	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	

Nota. Elaboración propia basado en las condiciones descritas por (Bouza-Mora et al., 2017).

Una vez obtenidos los amplificadores de la primera reacción, se montó la PCR semi-anidada. Esta se lleva a cabo con los primers TRP36- DF, TRP36- R1, y un máster mix comercial. Las cantidades que se utilizaron fueron: 12,5 µL de OneTaq® Máster mix (BioLabs), 3 µL de primer TRP36- DF y 3 µL de primer TRP36- R1 a una concentración de 10pmol cada uno, 4,5 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de amplificado de la primera reacción, con las condiciones para PCR descritas en la Tabla 4.

Tabla 4

Condiciones para la PCR semi-anidada con los primers TRP36- DF y TRP36- R1

Fase	Temperatura (°C)	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización final	95	30 segundos	35 ciclos
Alineamiento	57	30 segundos	
Extensión inicial	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	

Nota. Elaboración propia basado en las condiciones descritas por (Bouza-Mora et al., 2017).

Electroforesis. La electroforesis se realizó con un gel de agarosa al 2% preparado con TBE (Tris Borato EDTA) y 3,5 µL de colorante 6x HidraGreen™ Safe Loading Buffer y un marcador de peso molecular BioLabs® 100 pb DNA Ladder. El corrido de esta ejecutó a 70V por 1 hora y media. La revelación de los amplificados se llevó a cabo con un transiluminador de luz UV Invitrogen™ Safe Imager™ 2.0.

Secuenciación. Las secuencias fueron purificadas y secuenciadas mediante la técnica dideoxi terminal de Sanger en los laboratorios de Macrogen.

Capítulo IV

Resultados

Extracción de ADN

La optimización de la extracción de ADN bien sea con fenol- cloroformo alcohol isoamílico o por kit comercial, tuvo la premisa de lisis previa.

Respecto al método de fenol- cloroformo alcohol isoamílico la principal dificultad radicó en la fase acuosa resultante, debido a que su escasa cantidad aumenta la posibilidad de contaminación con la fase orgánica, por lo cual se agregó 200 µL de fosfato buffer salino (PBS) para resuspender el pellet, lo cual permitió aumentar el volumen de la fase acuosa.

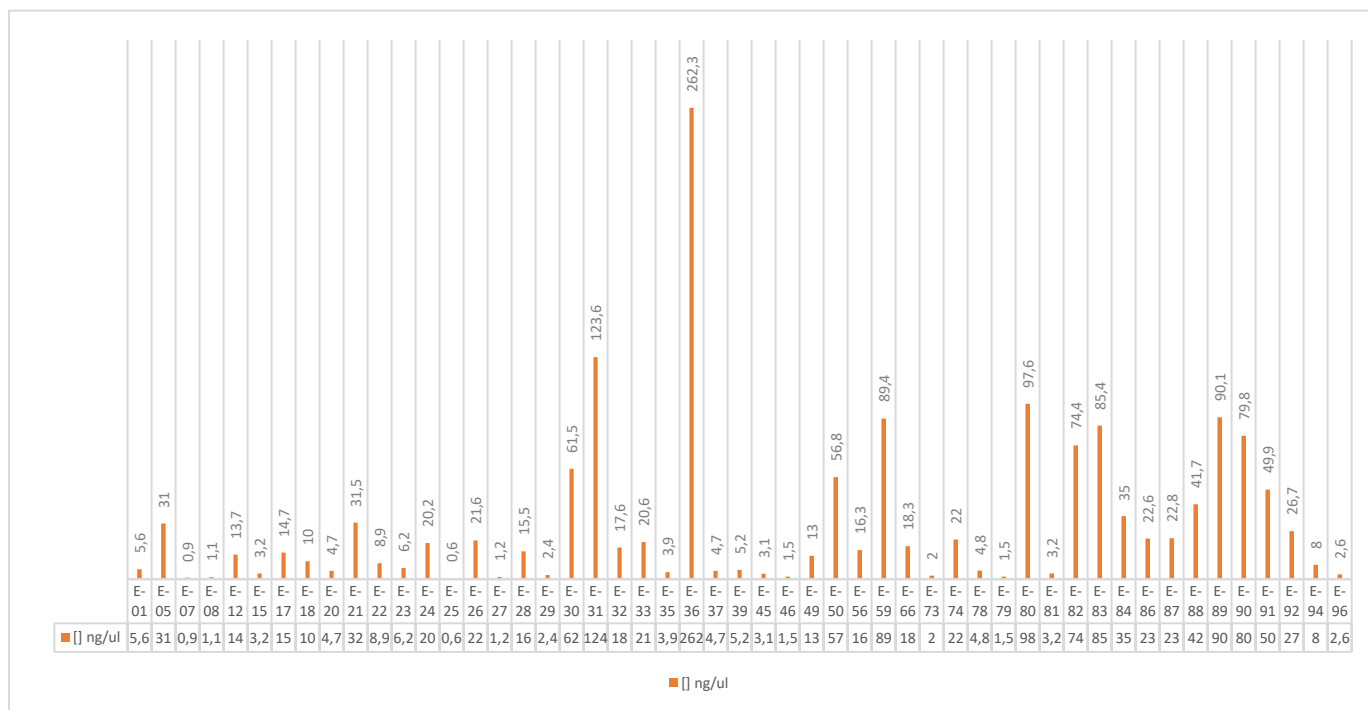
Cuantificación de ADN

Concentración. Se ejecutó con espectrofotometría para determinar la concentración de las muestras extraídas (Figura 7). Para este estudio, se escogieron muestras con una concentración promedio de 20 ng/µL, aunque el rango de concentración osciló de 0.6 ng/µL a 262.3 ng/µL. Con relación al método de extracción el consecutivo de E-01 hasta E-33 que se extrajo con el método fenol-

cloroformo alcohol isoamílico tuvo un promedio de 18.9 ng/μL, mientras que el consecutivo restante, de E- 34 hasta E-96 que realizó con kit comercial (Roche® e Invitek®) tuvo un promedio de 39.02 ng/μL.

Figura 7

Cuantificación de concentración de ADN por espectrofotometría en NanoDrop



Nota. Elaboración propia

260/280. Las 51 muestras de ADN se sometieron a este indicador para determinar la densidad óptica y establecer la pureza de las muestras para descartar posibles contaminaciones con algunas sustancias. Los resultados obtenidos estuvieron entre 1.45 y 1.97.

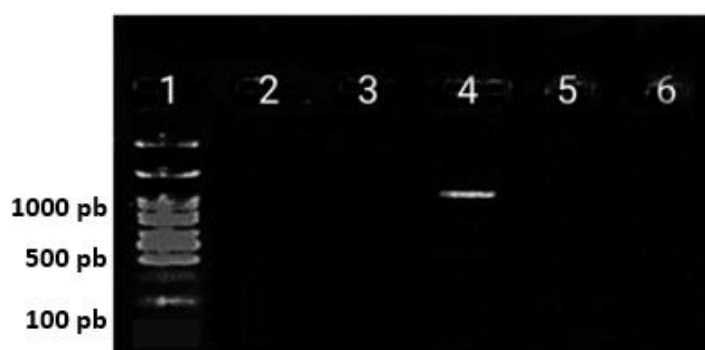
260/230. En las 51 muestras de ADN se determinó este parámetro para establecer la pureza de las muestras, mediante la densidad óptica obtenida para cualificarlas y descartar posibles contaminantes. Encontrándose valores dentro de los rangos permitidos.

PCR punto final

Los resultados conseguidos fueron obtenidos de 51 pacientes previamente diagnosticados con EMC mediante inmunocromatografía, posteriormente se realizó PCR con técnicas moleculares del gen 16S ARNr, estos se sometieron a PCR punto final con los primers TRP36-F2 y TRP36-R1 semi-anidada para la amplificación del gen *trp36* con las condiciones anteriormente descritas, realizándose electroforesis para verificar la presencia de amplificados (Figura 8).

Figura 8

Electroforesis de PCR punto final de Ehrlichia canis con primers TRP36



Nota. Amplificación de 800-1000pb correspondientes a la reacción externa con los primers TRP36-F2 y TRP36- R1, 1: Marcador de peso molecular, 2: E-73, 3: E-79, 4: E-83, 5: E-89, 6: Control negativo.

PCR semi-anidada

Una vez obtenida la reacción punto final, se sometió a PCR semi-anidada con los primers TRP36-DF y TRP36- R1 para la amplificación del gen *trp36* con las condiciones descritas anteriormente.

Una vez ejecutado el procedimiento para la PCR se logró amplificar en diferentes reacciones el segmento de interés, cuyo tamaño de 800-1000pb es específico para *E. canis*. Inicialmente se llevó a cabo una prueba con el objetivo de corroborar la eficacia de los primers y del protocolo y posteriormente se procedió a realizar la PCR semi-anidada del material genético seleccionado (Figuras 9, 10 y 11), obteniendo 4/51 (7.84%) amplificados que se observaron en electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Figura 9

Electroforesis de PCR semi- anidada de Ehrlichia canis con primers TRP36



Nota. Amplificación de PCR semi- anidada (35 ciclos) para determinación de TRP36 de *E. canis* utilizando los primers TRP36-DF y TRP36-R1, obteniendo un amplificado de 800-1000pb. 1: Marcador de peso molecular, 2: E-73, 3: E-79, 4: E-83, 5: E-89, 6: Control negativo.

Figura 10

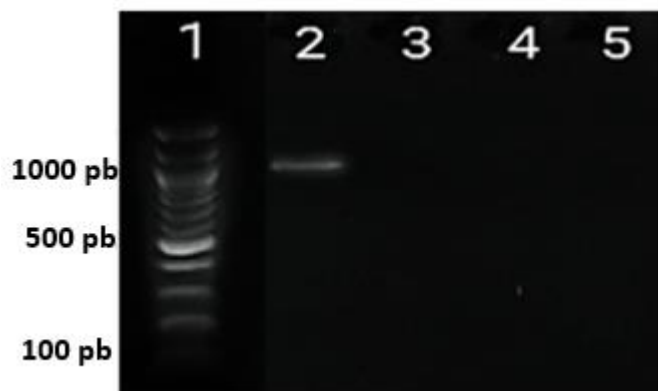
Electroforesis de PCR semi-anidada de Ehrlichia canis con primers TRP36



Nota. Amplificación de PCR semi- anidada (35 ciclos) para determinación de TRP36 de *E. canis* utilizando los primers TRP36-DF y TRP36-R1, obteniendo un amplificado de 800-1000pb. 1: Marcador de peso molecular, 2: E-05, 3: E-21, 4: E-24, 5: Control negativo.

Figura 11

Electroforesis de PCR semi- anidada de Ehrlichia canis con primers TRP36



Nota. Amplificación de PCR semi- anidada (35 ciclos) para determinación de TRP36 de *E. canis* utilizando los primers TRP36-DF y TRP36-R1, obteniendo un amplificado de 800-1000pb. 1: Marcador de peso molecular, 2: E-22, 3: E-32, 4: E-59, 5: Control negativo.

Secuenciación

Los productos de PCR de las cuatro muestras que amplificaron *trp36*, fueron secuenciados por MacroGen y se recibieron en diversos formatos, se utilizó en la forma FASTA y las secuencias *Forward* y *Reverse* se alinearon utilizando el programa CAP contig assembly que además genera la secuencia consenso en el software BioEdit®, seguidamente mediante el BLAST® con el programa blastx se tradujo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos y partir de esta se comparó con las repeticiones en tándem disponibles en GenBank para realizar la comparación.

Los resultados obtenidos se compararon con secuencias obtenidas del GenBank, las muestras E-22 y E-89 mostraron homología con el genogrupo Costa Rica de acuerdo con el número de acceso AVZ23582 del 98.64% y 98.28% respectivamente, con 6 repeticiones para la E-22 y 3 repeticiones para la E-89 de la secuencia de aminoácidos EASVVPAAEAPQPAQQTEDEFFSDGIEA. Las muestras E-24 y E-83 manifestaron homología con el genogrupo Estados Unidos, se utilizaron dos números de acceso del GenBank para realizar la comparación, QTT61925 para la muestra E-24, la cual arrojó 99.7% de homología con 12 repeticiones en tándem, mientras que la muestra E-83 mostró homología del 95.83%

de acuerdo con el número de acceso WIV62663 con 6 repeticiones en tándem, de la secuencia de aminoácidos TEDSVSAPA para ambas muestras (Tabla 5).

Tabla 5

Resultados de las muestras secuenciadas comparadas con en el GenBank

Muestra	Repetición en tándem	Número de repeticiones	Número de acceso con el que se comparó	Repeticiones del número de acceso	Porcentaje de homología	Genogrupo
E-22	EASVVPAAEAPQPAQQTEDEFFSDGIEA	6	AVZ23582	3	98.64%	CR
E-24	TEDSVSAPA	12	QTT61925	12	99.7%	US
E-83	TEDSVSAPA	6	WIV62663	9	95.83%	US
E-89	EASVVPAAEAPQPAQQTEDEFFSDGIEA	3	AVZ23582	3	98.28%	CR

Nota. Se observa la correlación realizada entre las secuencias obtenidas para la determinación del genogrupo con base en la secuencia de aminoácidos repetidas en tándem y su porcentaje de homología.

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

En el presente trabajo se logró la identificación de genogrupos de *Ehrlichia canis* mediante la secuenciación de los amplificadores de la reacción semi- anidada utilizando los primer TRP36, en pacientes previamente diagnosticados con EMC mediante técnicas moleculares con el gen 16S rRNA como blanco.

El método de extracción de ADN por fenol- cloroformo alcohol isoamílico, confiere ventajas sobre los métodos comerciales respecto al factor económico, aunque este puede resultar más fácilmente contaminado con restos de fenol o proteínas si se compara con el método de extracción por columna, este último, confiere menos riesgo de contaminación, siendo una extracción de alta pureza, a su vez que resulta más rápida la extracción (Alejos- Velázquez et al., 2014), para este caso se optó por realizar la lisis de glóbulos rojos previa, para facilitar el procedimiento de extracción y para optimizar el proceso de amplificación ya que se sabe que los restos de hemoglobina pueden inhibir la reacción de PCR (Saiki et al., 1988), de otra parte se evita el taponamiento de las columnas por coágulos, a la vez que se mejoró la matriz de ADN extraído, esto a pesar de que el fabricante no alude la necesidad de la lisis previa.

Alejos- Velázquez et al (2014) menciona que la concentración mínima requerida de ADN debe ser mayor a 5 ng/ μ L, dado que concentraciones menores dificultan la estandarización de la técnica molecular que se lleve a cabo, además que no resulta confiable que una concentración menor pueda reaccionar en PCR. Los resultados obtenidos fueron variables, a pesar de que se priorizaron las concentraciones altas, también se montaron dentro del protocolo concentraciones menores a lo que en principio se estableció como ideal 20 ng/ μ L, aunque se obtuvieron amplificaciones de concentraciones menores (8.9 ng/ μ L.).

Respecto a la determinación de la pureza del ADN, Desjardins & Conklin (2010) precisan que las relaciones 260/280 y 260/230 tienen valores que no presentan mayor variabilidad, siendo para el primero un ideal de 1.8 y para el segundo de 1.8 y 2.2 en muestras de ADN, estos autores mencionan que proporciones de pureza significativamente diferentes pueden indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que se absorben a 280 nm o cerca de este. Los rangos de pureza obtenidos en los dos parámetros estuvieron dentro del rango ideal.

Con los datos de cuantificación y pureza de las muestras de ADN, se evaluaron los métodos de extracción, las concentraciones más altas se obtuvieron con los métodos de extracción comerciales o columnas, a diferencia del método tradicional fenol- cloroformo alcohol isoamílico, aunque dos de las muestras que amplificaron la secuencia blanco, fueron extraídas con este método. Esto plantea que los métodos tradicionales como el fenol cloroformo mantienen la integridad del DNA y adicionalmente siguen siendo más económicos.

Para llevar a cabo este trabajo, primeramente, fue necesario el diagnóstico previo de *E. canis* por técnicas moleculares. De acuerdo con Harrus & Waner (2011), se han construido primers que tienen como objetivo el 16S rRNA de *Ehrlichia spp.*, pero se ha reportado que este es un gen conservado de la familia *Anaplasmataceae*, por lo que no es una región específica de especie, que permita la caracterización del agente etiológico, aunque también se utiliza como diagnóstico (Alves, Rieck, et al.,

2014). En un trabajo previo realizado en CEDIMOL Alarcón (2023), estandarizó la técnica basada en un gen ribosomal, utilizando los primers y las condiciones reportadas por (Aguirre et al., 2004), obteniendo 28 muestras positivas de 33 pacientes muestreados, a partir de pacientes en diversas fases de la enfermedad. Sin embargo a partir de este amplificado no se puede realizar la genotipificación debido a lo conservado del gen utilizado.

Para la genotipificación de *E. canis* fue necesaria la búsqueda de regiones que tuvieran variaciones detectables. Mavromatis et al (2006), encontraron un conjunto limitado de proteínas inmunorreactivas que incluían algunas glicoproteínas (*gp19*, *gp140* y *gp200*), bajo esta misma premisa, se habían informado diferencias en el gen *trp36*, que codifica una proteína inmunorreactiva, lo que indicaba cierto grado de diversidad del agente etiológico en la naturaleza, sugiriendo que resultaba útil para genotipificar las cepas, basándose en las repeticiones en tándem (Doyle et al., 2006; Hsieh et al., 2010).

En el presente trabajo se utilizaron, los primers universales TRP36-F2 y TRP36-R1 permitiendo obtener secuencias completas del gen *trp36* en una reacción y posteriormente se realizó una PCR semi-anidada. En todos los casos se realizó electroforesis en gel en la primera reacción, encontrándose sólo una amplificación, resultando concordante con lo reportado por diversos autores, donde la amplificación obtenida con PCR punto final requiere mejorar su especificidad. Por lo que se justificaba la realización de una segunda PCR semi-anidada (Aguar et al., 2013).

A pesar de que los dos primers mencionados abarcan el segmento blanco, (Aguar et al., 2014; Bouza-Mora et al., 2017; Navarrete et al., 2022) han optado por incluir otro primer (TRP36-DF), para realizar una PCR semi-anidada, tal como se hizo en este trabajo. Por lo que se utilizaron tres primers, uno de los cuales se repite, en la primera reacción o PCR punto final se amplifica un segmento considerable más grande de la región de interés, mientras que el segundo conjunto de primers amplifica sólo la región de interés, de esta forma cualquier producto inespecífico de la primera ronda, se elimina en la segunda,

resultando en un amplificado específico, lo que ineludiblemente mejora la especificidad de la reacción (Perera et al., 2018). En este trabajo, se tuvo mucho cuidado con la manipulación de los amplificados de la primera reacción o PCR punto final, los cuales fueron usados en la reacción semi-anidada debido a los riesgos de contaminación.

Respecto a las condiciones de PCR, se siguieron las recomendaciones de (Bouza-Mora et al., 2017) para la ejecución del procedimiento, aunque Aktas & Özübek (2019), establecieron parámetros que difieren un poco, específicamente en la temperatura de *annealing*, debido a que utilizaron una temperatura de 42.5°C por 30 segundos y no mencionan variaciones entre la PCR punto final y la PCR semi-anidada, a diferencia del realizado en este trabajo, cuya temperatura de *annealing* en la primera reacción estuvo en 52°C por 30 segundos, mientras que en la segunda fue de 57°C segundos, esto puede involucrar posibles alteraciones en la especificidad de la amplificación, dado que esta es la temperatura de alineamiento de los primers, por lo que variaciones muy altas o bajas no permiten la alineación correcta de estos.

En relación con la amplificación de la reacción semi-anidada, en este trabajo fue de 7%, lo que comparado con otros estudios se relacionan, dado que oscila de 11.6 a 14% (Arroyave et al., 2020; Forero-Becerra et al., 2021). Estos porcentajes respecto a la población estudiada pueden estar relacionados con la sensibilidad y especificidad de la reacción, debido a que solamente amplifica a *E. canis* y no tiene en cuenta que otras especies de *Ehrlichia* como *E. ewingii* y *E. chaffeensis* que pueden estar relacionadas con la infección en caninos. Sumado a que las pruebas de inmunocromatografía generan reacciones cruzadas con toda la familia *Anaplasmataceae* hace que la población inicialmente diagnosticada se encasille como EMC, sin determinar realmente que agente etiológico este ocasionando los signos. Esto plantea que debe determinarse el estado epidemiológico de las otras especies de *Ehrlichia* en la población canina y debido a que no hay estudios que avalen esta hipótesis, puede que la prevalencia de estas especies sea mayor o al menos muy parecida a *E. canis*. Además, en este tipo de

estudios, debería evaluarse la incidencia con otros hemoparásitos mediante método con alta especificidad y sensibilidad, lo que permitiría tener datos más precisos, sumado a que se caracterizarían otras enfermedades emergentes.

La secuenciación se realizó por el método dideoxinucleótido terminal de Sanger, una vez obtenidas las secuencias *Forward* y *Reverse*, se alinearon de forma complementaria con el programa CAP contig assembly del software BioEdit®, diversos autores como Navarrete et al (2022), utilizaron ClustalW de BioEdit® o Arroyave et al (2020) usaron GeneStudio, la divergencia entre los software utilizados radica en que el sistema que se ejecutó en este trabajo, permitió alinear y generar una secuencia consenso entre las dos secuencias de la misma muestra en un solo paso, a diferencia de las otras, donde es necesario más de dos pasos para alinear y generar la secuencia consenso.

Los resultados de otros estudios realizados en Colombia acerca de la caracterización de *E. canis*, corroboran los obtenidos en este trabajo para la zona en estudio. (Arroyave et al., 2020; Forero-Becerra et al., 2021), reportan la presencia en Medellín y el departamento del Cauca de los genogrupos, Brasil (BR), Costa Rica (CR) y Estados Unidos (US), siendo los dos últimos, los que se encontraron circulando en la caracterización que se ejecutó. En las investigaciones del país, puede deducirse que la mayor circulación la da US, seguida de CR y finalmente BR, aunque por los escasos estudios de caracterización, no se puede asegurar que la situación epidemiológica sea la misma en todo el territorio nacional. Además, países vecinos como Brasil, han demostrado la circulación de estos tres genotipos (Aguiar et al., 2013; Taques et al., 2020), mientras que en Perú se ha verificado CR y US, pero en los demás países no ha habido reportes, lo cual deriva en que no se conozca la situación actual de la EMC; esto puede conllevar a una reemergencia mayor en los cánidos domésticos y silvestres, de entornos urbanos y rurales.

Respecto a las manifestaciones clínicas, parece que los genogrupos que más se dispersan por diversas regiones geográficas, tienen menor capacidad de patogenicidad. (Navarrete et al., 2022)

encontró que sólo un paciente que fue infectado naturalmente por el genogrupo US, presentó signos hemorrágicos, pero que no revistieron mayor complicación, mientras que los demás fueron asintomáticos, asimismo que otros pacientes a los cuales se les determinó el genogrupo Cuba (CUB), el cual está circunscrito en el oeste de la isla y no se ha reportado en otras entidades nacionales, sufrieron lesiones hemorrágicas de mayor severidad, como epistaxis, anorexia, emaciación marcada. Respecto al genogrupo CR, Geiger et al (2018), concluyeron que caninos asintomáticos están infectados con cepas de *E. canis* genéticamente distintas, en las que se incluye este genotipo. De acuerdo con la base de datos de EMC de CEDIMOL (Anexo 1), el paciente E-22, correspondiente al genogrupo CR, manifestó signos relacionados con EMC, incluyendo anorexia y emaciación. El paciente E-24, correspondiente al genogrupo US, no presentó signos de carácter hemorrágico, aunque si historial de contacto con el vector. Los pacientes E-83 perteneciente al genogrupo US y E- 89 al genogrupo CR, manifestaron signos leves, principalmente inapetencia, pero no hubo lesiones hemorrágicas evidentes. Esto plantea una problemática, ya que a pesar del bajo número de secuencias obtenidas en este trabajo no se encontró una relación directa de los genogrupos con presencia o ausencia de signos clínicos.

En este estudio se determinó la presencia de genogrupos de *E. canis* en muestras obtenidas por CEDIMOL, sin embargo, este ejercicio debe continuar para consolidar el estado epidemiológico molecular de la enfermedad en la región, además a pesar de que autores como (Mylonakis et al., 2010; Ferreira et al., 2014) mencionan la posible relación de que la patogenicidad de la enfermedad está relacionada con las variaciones genéticas del agente etiológico, los estudios continúan siendo exiguos y estos se focalizan en determinar la circulación de los genogrupos, pero poco se ha correlacionado con las manifestaciones clínicas, por lo que resulta imperante realizarlo, no obstante, la EMC y su agente etiológico, continua siendo una enfermedad prevalente, de la clínica diaria, que muestra una gama variada de signos clínicos.

Capítulo V

Conclusiones

Los procesos de extracción de ADN son susceptibles a contaminación, por lo que, en casos donde se necesite secuenciar, los métodos comerciales resultan ser una opción que permite obtener mayor cantidad de material genético, con menor riesgo de contaminación de la matriz.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron precisas en este estudio para la amplificación del gen *trp36*, de esta manera, se estableció un protocolo que permite continuar con la caracterización molecular de genotipos de *E. canis*.

La técnica de PCR semi-anidada mostró mayor especificidad con relación a la PCR punto final, para la obtención del gen blanco, que permitió obtener los amplificados que posteriormente se secuenciaron.

La amplificación del gen *trp36* permitió la obtención de secuencias específicas de especie, que además de servir como diagnóstico del agente etiológico, permitieron su caracterización.

La secuenciación de los amplificados permitió vislumbrar la circulación de los genogrupos de *E. canis* en las muestras que se obtuvieron, debido a que es un paso importante para determinar las variaciones patogénicas de la EMC, siendo la puerta de entrada para establecer el estado epidemiológico de la enfermedad a nivel molecular.

Recomendaciones

Unificar las bases de datos de la enfermedad, adjunto al historial clínico completo de los pacientes, para establecer la relación de patogenicidad con los signos clínicos manifestados, en estudios posteriores permitirá correlacionar de una manera prolija y precisa el diagnóstico molecular, la genotipificación y el entorno clínico.

Continuar con el proyecto de investigación con otras muestras, esto permitirá realizar un seguimiento epidemiológico de pequeña escala que con el tiempo proporcionará información crucial

para la vigilancia y control de la enfermedad. En lo posible, incluyendo diversos nucleas urbanos y rurales del departamento, para generar un impacto social en la sanidad pública y animal.

Referencias bibliográficas

- Aguiar, D. M., Zhang, X., Melo, A. L. T., Pacheco, T. A., Meneses, A. M. C., Zanutto, M. S., Horta, M. C., Santarém, V. A., Camargo, L. M. A., McBride, J. W., & Labruna, M. B. (2013). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 164(3-4), 315-321.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.015>
- Aguiar, D. M., Ziliani, T. F., Zhang, X., Melo, A. L. T., Braga, Í. A., Witter, R., Freitas, L. C., Rondelli, A. L. H., Luis, M. A., Sorte, E. C. B., Jaune, F. W., Santarém, V. A., Horta, M. C., Pescador, C. A., Colodel, E. M., Soares, H. S., Pacheco, R. C., Onuma, S. S. M., Labruna, M. B., & McBride, J. W. (2014). A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(5), 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.010>
- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusategui, I., López, L., Rodríguez-Franco, F., Luaces, I., Cortés, O., & Tesouro, M. A. (2004). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 125(3), 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.007>
- Aktas, M., & Özübek, S. (2019). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.003>
- Alarcón, A. V. A. (2023). Determinación de la Presencia de *Ehrlichia canis* en Caninos Mediante la Técnica de PCR. *Repositorio Hulago Universidad de Pamplona*.
- Alejos- Velázquez, L. P., Aragón- Martinez, M. del C., & Cornejo- Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En *Herramientas Moleculares Aplicadas a Ecología*.

Alves, R. N., Levenhagen, M. A., Levenhagen, M. M. M. D., Rieck, S. E., Labruna, M. B., & Beletti, M. E.

(2014). The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Veterinary Microbiology*, 168(2-4), 442-446. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.030>

Alves, R. N., Rieck, S. E., Ueira-Vieira, C., Labruna, M. B., & Beletti, M. E. (2014). Isolation, in vitro propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an *Ehrlichia canis* strain from southeastern Brazil. *Journal of Veterinary Science*, 15(2), 241-248.

<https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.2.241>

Arroyave, E., Rodas-González, J. D., Zhang, X., Labruna, M. B., González, M. S., Fernández-Silva, J. A., & McBride, J. W. (2020). *Ehrlichia canis* TRP36 diversity in naturally infected-dogs from an urban area of Colombia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(3), 101367.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101367>

Bouza-Mora, L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J. J., Salazar-Sánchez, L., Labruna, M. B., & Aguiar, D. M. (2017). Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(1), 36-40.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.012>

Carrillo Bonilla, L. M., Betancur Cardona, S., Roldán Cardona, D., Pérez Jaramillo, J. E., Galeano Rivera, D., Loaiza Echeverría, É. T., & Giraldo Echeverría, C. A. (2012). Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 38-46.

Cartagena Yarce, L. M. M., Ríos Osorio, L. A., & Cardona Arias, J. A. (2015). Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Revista de Medicina Veterinaria*, 29, 51. <https://doi.org/10.19052/mv.3446>

- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 45, 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Doyle, C. K., Cardenas, A. M., Aguiar, D., Labruna, M., Ndip, L., Yu, X.-J., & McBride, J. (2006). Molecular Characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 Tandem Repeats among Isolates from Different Geographic Locations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063, 433-435. <https://doi.org/10.1196/annals.1355.079>
- Doyle, C. K., Zhang, X., Popov, V. L., & McBride, J. W. (2005). An Immunoreactive 38-Kilodalton Protein of *Ehrlichia canis* Shares Structural Homology and Iron-Binding Capacity with the Ferric Ion-Binding Protein Family. *Infection and Immunity*, 73(1), 62-69. <https://doi.org/10.1128/iai.73.1.62-69.2005>
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & 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. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Ferreira, R. F., Cerqueira, A. D. M. F., Castro, T. X. D., Ferreira, E. D. O., Neves, F. P. G., Barbosa, A. V., Macieira, D. D. B., & Almosny, N. R. P. (2014). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(3), 301-308. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014055>
- Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. En *Herramientas Moleculares Aplicadas a Ecología* (pp. 27-51).
- Forero-Becerra, E., Patel, J., Martínez-Díaz, H.-C., Betancourt-Ruiz, P., Benavides, E., Durán, S., Olaya-Másmela, L.-A., Bolaños, E., Hidalgo, M., & McBride, J. W. (2021). Seroprevalence and Genotypic

- Analysis of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs and Humans in Cauca, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(5), 1771-1776. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0965>
- Geiger, J., Morton, B. A., Vasconcelos, E. J. R., Tngrian, M., Kachani, M., Barrón, E. A., Gavidia, C. M., Gilman, R. H., Angulo, N. P., Lerner, R., Scott, T., Mirrashed, N. H., Oakley, B., & Diniz, P. P. V. P. (2018). Molecular Characterization of Tandem Repeat Protein 36 Gene of *Ehrlichia canis* Detected in Naturally Infected Dogs from Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(2), 297-302. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0776>
- Guerrero, C. G. (2016). *PROBLEMÁTICA DE LA EHRLICHIOSIS CANINA VISTA DESDE EL ASPECTO TEÓRICO Y EL ASPECTO CLÍNICO EN UNA CLÍNICA VETERINARIA DE BOGOTÁ (CENTRAL DE URGENCIAS VETERINARIAS)*.
- Gutiérrez, C. N., Perez Yabarra, L., & Agrela, I. F. (2016). Ehrlichiosis Canina. *Saber*, 28(4), 641-665.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- Hsieh, Y.-C., Lee, C.-C., Tsang, C.-L., & Chung, Y.-T. (2010). Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. *Veterinary Microbiology*, 146(1-2), 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.013>
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (1990). *PCR protocols. A guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- Kumar, R., Verma, H., & Diwakar, R. (2020). Canine ehrlichiosis: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.
- Labruna, M. B., & Machado, R. Z. (2006). Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. <https://repositorio.usp.br/item/001807836>

- Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 40(6), 1121-1140. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004>
- Liu, Y., Zhang, Z., Jiang, Y., Zhang, L., Popov, V. L., Zhang, J., Walker, D. H., & Yu, X. (2011). Obligate intracellular bacterium *Ehrlichia* inhibiting mitochondrial activity. *Microbes and Infection*, 13(3), 232-238. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.10.021>
- Marcondes, C. B. (Ed.). (2017). *Arthropod Borne Diseases*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>
- Martín, J. M. V., Ortigosa, F., & Cañas, R. A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros en la Biología*, 13(173), Article 173. <https://doi.org/10.24310/enbio.v13i173.17342>
- Martín, P. L. (2018). *Comparación de métodos moleculares y serológicos para el diagnóstico de ehrlichiosis monocítica canina* [Tesis, Universidad Nacional de La Plata]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66786>
- Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., Shin, M., Malfatti, S., Larimer, F., Copeland, A., Detter, J. C., Land, M., Richardson, P. M., Yu, X. J., Walker, D. H., McBride, J. W., & Kyrpides, N. C. (2006). The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4015-4023. <https://doi.org/10.1128/jb.01837-05>
- McCown, M. E., Alleman, A., Sayler, K. A., Chandrashekar, R., Thatcher, B., Tyrrell, P., Stillman, B., Beall, M., & Barbet, A. F. (2014). Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. *Journal of Special Operations Medicine: A Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 14(4), 81-85. <https://doi.org/10.55460/1VBK-JXC7>

- McCown, M. E., 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: A Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 14(1), 86-90. <https://doi.org/10.55460/YYT5-90FP>
- Moumène, A., & Meyer, D. F. (2016). *Ehrlichia's* molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes and Infection*, 18(3), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.11.001>
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Munhoz, T. D., Faria, J. L. M., Vargas-Hernández, G., Fagliari, J. J., Santana, Á. E., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21, 206-212. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000300006>
- Mylonakis, M. E., Siarkou, V. I., & Koutinas, A. F. (2010). Myelosuppressive Canine Monocytic Ehrlichiosis (*ehrlichia Canis*): An Update on the Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 65(4), 129-135.
- Navarrete, M. G., Hodžić, A., Corona-González, B., Cordeiro, M. D., da Silva, C. B., Báez, L. C., Obregón, D., de Aguiar, D. M., da Silva Campos, A. N., Taques, Í. I. G. G., Wu-Chuang, A., López, E. R., Piloto-Sardiñas, E., Abuin-Denis, L., da Fonseca, A. H., & Cabezas-Cruz, A. (2022). Novel *Ehrlichia canis* genogroup in dogs with canine ehrlichiosis in Cuba. *Parasites & Vectors*, 15(1), 295. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05426-0>
- Neave, M. J., Mileto, P., Joseph, A., Reid, T. J., Scott, A., Williams, D. T., & Keyburn, A. L. (2022). Comparative genomic analysis of the first *Ehrlichia canis* detections in Australia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(3), 101909. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101909>

- Perera, C. L., Acevedo, A. M., Perera, C. L., & Acevedo, A. M. (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*, 40(3).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2018000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Polanco, D. N., & Ríos, L. A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81-95.
- Procajło, A., Skupień, E., Bladowski, M., & Lew, S. (2011). Monocytic Ehrlichiosis in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0077-9>
- Rikihisa, Y. (2006). Ehrlichia subversion of host innate responses. *Current Opinion in Microbiology*, 9(1), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.003>
- Rojas-Triviño, A., Rueda-Hurtado, A., Díaz, D. M., Mesa-Cobo, N. C., Benavides-Montaña, J. A., Imbach-López, K., Álvarez-Ríos, L., & López, R. (2013). Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinaria y Zootecnia*, 7.
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409-6412.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Sandoval, A. S., Floresvillar, J. F., & Meza, A. (2013). *Reacción en cadena de la polimerasa*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
- Sandoval, A. S., Martínez, A. B., & López de la Mora, D. (2013). *Extracción de ácidos nucleicos*. McGraw Hill Medical.
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743658>

- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Siarkou, V. I., Mylonakis, M. E., Bourtzi-Hatzopoulou, E., & Koutinas, A. F. (2007). Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), 304-312.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.021>
- Silva-Molano, R. F., Sánchez-Ucrós, N., & Loaiza-Echeverri, A. M. (2008). *Reporte de presentación de Ehrlichia canis en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia*.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Taques, I. I. G. G., Campos, A. N. S., Kawasaki, M. L., de Almeida, S. L. H., & de Aguiar, D. M. (2020). Geographic Distribution of *Ehrlichia canis* TRP Genotypes in Brazil. *Veterinary Sciences*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040165>
- Vallejo- Forero, J. de los A. (2022). Evaluación de métodos de diagnóstico serológico y molecular en caninos naturalmente expuestos a *Ehrlichia canis* de áreas endémicas del centro de Colombia. *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*. Disponible en:
<https://repository.udca.edu.co/handle/11158/5070>.
- 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.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>

Zhang, X., Luo, T., Keysary, A., Baneth, G., Miyashiro, S., Strenger, C., Waner, T., & McBride, J. W. (2008).

Genetic and Antigenic Diversities of Major Immunoreactive Proteins in Globally Distributed
Ehrlichia canis Strains. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(7), 1080-1088.

<https://doi.org/10.1128/CVI.00482-07>

Anexos

Base de datos de los pacientes participantes

Código	Paciente	Edad	Centro veterinario	Tipo de diagnóstico	Otros hemoparásitos	Resultado PCR TRP36
E-01	Luna	2 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	Test rápido positivo a Ehrlichia	Hepatozoon	Negativo
E-05	Luna	1 mes	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Cuadro hemático, sintomatología, presencia de garrapatas	No	Negativo
E-07	Sky	5 meses	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Test rápido positivo a Ehrlichia	No	Negativo
E-08	Rupert	5 años	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Test rápido positivo a Ehrlichia cuando era cachorro	No	Negativo
E-12	Mona	10 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta		No	Negativo
E-15	Scott	1 año	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	Test rápido positivo a hemoparásitos	Anaplasma	Negativo
E-17	Max	10 meses	Hospital Veterinario- Cúcuta	Test rápido positivo a Anaplasma, se sospecha de Ehrlichia	Anaplasma	Negativo
E-18	Tilín	18 meses	Hospital Veterinario- Cúcuta	Test rápido positivo a hemoparásitos	Anaplasma	Negativo
E-20	Chaz	4 años	Hospital Veterinario San Rafael- Cúcuta	Test rápido positivo	No	Negativo
E-21	Dogui	5 años	Mis Peluditos- Cúcuta	No presenta test, se sospecha por sintomatología		Negativo
E-22	Kyra	1 año	Hospital Veterinario- Cúcuta	Test rápido positivo a Ehrlichia, sintomatología	No	Positivo
E-23	Zoe	7 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	Presenta test positivo, sintomatología	No	Negativo
E-24	Candy	10 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	Se sospecha por contacto con el vector		Positivo
E-25	Estrella	3 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	Test positivo a Ehrlichia	No	Negativo
E-26	Prince	5 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	Se sospecha por contacto con el vector	No	Negativo
E-27	Lola	3 meses	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Presenta test positivo a Ehrlichia	No	Negativo
E-28	Canela	7 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Presencia de garrapatas	No	Negativo
E-29	n.n	2 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Presencia de garrapatas	No	Negativo
E-30	Ringo	4 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Presencia de garrapatas	No	Negativo
E-31	Tobby	1 año	Mis Peluditos- Cúcuta	Presencia de garrapatas, sintomatología	No	Negativo
E-32	Ringo	3 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Presencia de garrapatas	No	Negativo
E-33	Laika	10 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Sospecha por sintomatología	No	Negativo
E-35	Sol	9 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Sospecha por sintomatología	No	Negativo
E-36	Olafo	6 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Sospecha por sintomatología	No	Negativo
E-37	Mateo	5 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Sospecha por sintomatología	No	Negativo

E-39	Toby	5 meses	Mis Peluditos- Cúcuta	Sospecha por sintomatología	No	Negativo
E-45	Ghost	11 meses	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Test positivo Ehrlichia.	No	Negativo
E-46	Beily	3 años	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Test positivo Ehrlichia.	No	Negativo
E-49	Kira	Semillero	Semillero	Semillero	No	Negativo
E-50	Bella	2 años	Mis Peluditos- Cúcuta	Sospecha por sintomatología	No	Negativo
E-56	Aslan	4 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Sospecha por sintomatología y Test positivo	No	Negativo
E-59	Yara	1 año 8 meses	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo	Anaplasma	Negativo
E-66	Hatei	Hembra, 1 año y 6 meses	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo	No	Negativo
E-73	Anker	Propietario: XAVIER JARAMILLO	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona			Negativo
E-74	Ojitos	5 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	No	Negativo
E-78	Duquesa	8 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	No	Negativo
E-79	Tequila	5 meses	Clínica Veterinaria Universidad de Pamplona.	Sospecha de Hemoparásitos por sintomatología, NO TEST.	No	Negativo
E-80	Annie	4 meses	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	TEST POSITIVO Anaplasma Negativo Ehrlichia	Anaplasma postivo PCR	Negativo
E-81	Otto	1 año	Clínica Veterinaria Universidad de Pamplona	Test positivo de Ehrlichia/ sospecha de Anaplasma	No	Negativo
E-82	Pandora		Profesora Diana Ospina		No	Negativo
E-83	Cuky	6 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test de Ehrlichia positivo	No	Positivo
E-84	Mateo	10 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test de Ehrlichia positivo	No	Negativo
E-86	Matías	8 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	No	Negativo
E-87	Churca	5 años	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	No	Negativo
E-88	Max	5 años, golden, macho	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	No	Negativo
E-89	Simón	4 años 3 meses	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test indeterminado	No	Positivo
E-90	Naomi	1 año, hembra, cocker	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	No	Negativo
E-91	Luna Gómez	4 años, pinscher, hembra	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia	Anaplasma	Negativo
E-92	Igo		Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona			Negativo
E-94	Yuca	1 año, hembra	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	Test positivo de Ehrlichia		Negativo
E-96	Mila	1 mes 19 días	Clínica veterinaria- VETMEDICAL-Pamplona	No test	No	Negativo