

Determinación de la Presencia de *Ehrlichia canis* en Caninos Mediante la Técnica de PCR

Andrea Valentina Alarcón Suarez

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de

Pamplona

Junio 2023



Nota del autor

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

Universidad de Pamplona, Pamplona N.S

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:

andrea.alarcon@unipamplona.edu.co

Determinación de la Presencia de *Ehrlichia canis* en Caninos Mediante la Técnica de PCR

Andrea Valentina Alarcón Suarez

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

Director

Jesús Alberto Mendoza Ibarra DMV M. Sc.; PhD

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona

Pamplona, Norte de Santander, Colombia

2023

Dedicatoria

*A mi abuelo Q.E.P.D y a mi abuela quienes han sido el motor de mi vida, mi apoyo
más grande y mi ejemplo a seguir.*

*A mis padres por alentarme a seguir adelante y no permitirme renunciar a pesar de
todas las dificultades en el camino.*

Agradecimientos

A Dios por guiar mi camino y darme la fuerza para seguir adelante y no desfallecer.

A mis padres por apoyarme en cada paso, en cada momento difícil y por creer en mí.

A las personas que estuvieron a mi lado motivándome y alentándome a creer en mí misma cuando todo se venía abajo.

Al DMV M. Sc.; Ph. D Jesús Alberto Mendoza por su paciencia, dedicación y enseñanzas durante estos meses.

Al grupo CEDIMOL por su disposición, enseñanzas, empatía y la alegría que los caracteriza.

Tabla de contenido

Introducción	9
Descripción del sitio de pasantía.....	10
Descripción de las actividades de pasantía	11
Resumen.....	12
Abstract	13
Capítulo I	14
1.1 Planteamiento del Problema.....	14
1.2 Justificación.....	16
1.3 Objetivos	18
1.3.1. Objetivo general	18
1.3.2. Objetivos específicos.....	18
Capítulo II	18
2.1 Introducción	18
2.2. Revisión Bibliográfica.....	19
2.2.1 Etiología.....	19
2.2.2 Epidemiología.....	22
2.2.3 Fisiopatología	26
2.2.4 Métodos diagnósticos	30
2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31

Capítulo III.....	41
3.1. Metodología	41
3.1.1 Población de estudio.....	41
3.1.2 Recolección y conservación de las Muestras	41
3.1.3 Lisis de Glóbulos rojos.....	41
3.1.4 Extracción de ADN	42
3.1.5. Cuantificación del ADN	42
3.1.6 PCR punto final	43
Capítulo IV.....	45
4.1. Resultados	45
4.1.1. Extracción de ADN	45
4.1.2. Cuantificación de ADN	46
4.1.3. PCR en punto final	46
4.2 Discusión.....	53
Capítulo V.....	58
5.1. Conclusiones	58
5.2. Recomendaciones.....	58
5.3. Referencias	59
Anexos	69

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Antigua clasificación del género Ehrlichia spp</i>	20
Tabla 2 <i>Clasificación taxonómica de Ehrlichia canis</i>	22
Tabla 3 <i>Signos clínicos en las diferentes fases de la Ehrlichiosis canina.</i>	29
Tabla 4 <i>Secuencia de cebadores utilizados para el diagnóstico de PCR en pacientes sospechosos a EMC.</i>	43
Tabla 5 <i>Elementos utilizados para la PCR</i>	44
Tabla 6 <i>Relación de los diferentes métodos diagnósticos</i>	52

Índice de figuras

Figura 1 <i>Representación del genoma de Ehrlichia canis</i>	21
Figura 2 <i>Formación de la fase acuosa y la fase orgánica con el método fenol- cloroformo</i>	34
Figura 3 <i>Etapas de la PCR</i>	36
Figura 4 <i>Electroforesis</i>	37
Figura 5 <i>Reporteros SyberGreen</i>	38
Figura 6 <i>Curva de amplificación</i>	39
Figura 7 <i>Curva de disociación</i>	40
Figura 8 <i>Amplificación por PCR de las muestras de prueba</i>	47
Figura 9 <i>Resultados de la electroforesis para las muestras de ADN E02, E05, E06, E07, E10, E11, E12 y E13.</i>	48
Figura 10 <i>Resultados de la electroforesis para las muestras de ADN E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E20.</i>	49
Figura 11 <i>Resultados de la electroforesis para las muestras de ADN E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31, E32, E33, E34</i>	50
Figura 12 <i>Porcentajes de animales positivos y negativos a la PCR para detectar Ehrlichia canis</i>	51

Introducción

Los médicos veterinarios como profesionales de las ciencias animales, tienen la responsabilidad de velar por la comunidad mediante el cuidado y la atención oportuna de sus mascotas, así como la prevención de enfermedades potencialmente riesgosas para los humanos. Es por esto que la salud publica juega un rol importante en el contexto “ONE WORLD ONE HEALTH”, el cual indica como los médicos veterinarios en conjunto con profesionales de la salud humana, velan por la salud, el bienestar, la protección del medio ambiente y el control y erradicación de enfermedades.

A lo largo de su formación académica, el médico veterinario adquiere conocimientos en diversas áreas para el estudio de la vida y salud animal, tales como la responsabilidad de prevenir, curar, mejorar la producción, la calidad de los productos, pero también es de vital importancia, su actualización constante en temas de, investigación, diagnósticos más especializados, prevención y erradicación de enfermedades zoonóticas, así como, garantizar la inocuidad de alimentos y la convivencia segura con las diferentes especies animales.

El programa de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pamplona, desde sus inicios, se ha venido enfocando en formar profesionales íntegros, con capacidad de liderazgo, competentes y éticos. Con este fin su principal objetivo se ve orientado a construir desde la academia futuros profesionales que adquieran un compromiso con la salud animal y humana mediante la producción de alimentos inocuos, la salud pública y la prevención de enfermedades.

Dentro de las modalidades para optar por el título de Médico Veterinario de la Universidad de Pamplona, se encuentra la pasantía práctica en investigación. En esta ocasión el sitio de elección para la pasantía fue el Centro Experimental de Diagnostico e Investigación

Molecular (CEDIMOL), ubicado en Pamplona, Norte de Santander, donde el objetivo principal fue la estandarización de pruebas moleculares (PCR) para la detección de *Ehrlichia canis*, en caninos a partir de muestras de sangre.

El presente escrito describe el trabajo desarrollado durante la pasantía, los procesos llevados a cabo en cada una de las etapas del proyecto de investigación, análisis y conclusión del estudio realizado.

Descripción del sitio de pasantía

El Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular (CEDIMOL) abrió sus puertas en el año 2020 con el fin de brindar apoyo durante la emergencia sanitaria por COVID-19 en el departamento de Norte de Santander.

CEDIMOL, cuenta con el respaldo del Instituto Nacional de Salud (INS) y el Instituto Departamental de Salud (IDS). En un principio su objetivo era prestar su servicio como un laboratorio colaborador del INS, en el diagnóstico molecular del virus SARS-CoV-2, y continuar su labor en el estudio molecular de dicho patógeno.

CEDIMOL cuenta con 2 laboratorios ubicados en la ciudad de Cúcuta y el laboratorio de Ciencias Biomédicas en la sede principal de la Universidad de Pamplona, en el edificio Eduardo Cote Lamus en Pamplona, Norte de Santander. Además de prestar sus servicios como centro de diagnóstico a la comunidad, CEDIMOL impulsa la investigación en distintas áreas, incluyendo el área de diagnóstico molecular para enfermedades veterinarias, enfermedades parasitarias, tropicales e infecciosas de importancia en la salud pública, planteando soluciones para el diagnóstico y control de los agentes infecciosos más comunes en nuestro medio.

Actualmente el laboratorio se encuentra bajo la dirección de los Bacteriólogos Raúl Rodríguez Martínez, Diana Boada, Reynaldo Gutiérrez y el Médico Veterinario Jesús Alberto Mendoza.

Dentro de sus instalaciones, el laboratorio de Ciencias Biomédicas CEDIMOL cuenta con distintas áreas para el procesamiento de muestras, áreas que originalmente fueron diseñadas para el diagnóstico de COVID 19, por lo que comprenden: área “sucia” en la cual se realizan procesos de recepción, desembalaje e inactivación de muestras y extracción de ácidos nucleicos, los cuales pasan a un área “limpia”, donde se lleva a cabo el montaje para el diagnóstico mediante la técnica PCR en tiempo real. Adicionalmente el laboratorio cuenta con áreas para toma de muestras, inmunología, inmunofluorescencia, electroforesis, química sanguínea, neveras, microscopia y secuenciación de ácidos nucleicos. Actualmente se llevan a cabo estudios para la incorporación de servicios diagnósticos y estudios moleculares en el área de la Medicina veterinaria.

Descripción de las actividades de pasantía

Durante el periodo de pasantía realizado en el laboratorio de Ciencias Biomédicas, se llevaron a cabo diferentes actividades directamente relacionadas con el proyecto de investigación, como lo son la obtención de muestras de sangre de animales sospechosos o positivos a Ehrlichiosis Monocítica Canina, (EMC), así como la obtención de el vector (garrapata), extracción del ADN, estudio bioinformático de los primers a usar en el proceso de estandarización, aplicación de la PCR en punto final, análisis de los resultados y redacción del informe final.

Otras actividades, incluyeron, la limpieza y desinfección tanto de áreas como de material utilizado, esterilización de material y su organización, participación en el semillero SIDEIN, participación en capacitaciones, revisión de literatura y apoyo al personal del laboratorio.

Resumen

La Ehrlichiosis canina o Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad transmitida por garrapatas que afecta a caninos tanto salvajes como domésticos. Su agente etiológico es la *Rickettsia Ehrlichia canis*, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*. Esta enfermedad multisistémica afecta a todos los caninos sin importar raza, edad o sexo, pudiendo en la mayoría de los casos llegar a ser mortal. Es transmitida por el vector *Rhipicephalus sanguineus*, una garrapata blanda perteneciente a la familia *Ixodidae* que usualmente se encuentra en climas cálidos o tropicales distribuida alrededor del mundo.

El presente trabajo se llevó a cabo mediante la recolección de muestras de sangre obtenidas de 33 pacientes de distintas clínicas veterinarias tanto de la ciudad de Cúcuta como de Pamplona, Norte de Santander. Estos presentaban sintomatología asociada o sospecha de EMC, o que contaran con un test de inmunocromatografía positivo o negativo y/o presencia de garrapatas.

Inicialmente se realizó la extracción de ADN de cada una de las muestras utilizando el método fenol- cloroformo, a la cuantificación del ADN se obtuvo un promedio de 20 ng/ul. Para el montaje de la PCR se utilizaron los primers ECC y ECB posteriormente descritos y las condiciones de la PCR fueron adaptadas en el laboratorio obteniendo un amplificado de 500 pb en 28 de las muestras estudiadas y 5 muestras negativas.

Este trabajo constituye la primera aproximación diagnóstica molecular a *E. canis* en CEDIMOL y será la base para la continuación de estudios posteriores.

Palabras clave: *Ehrlichia*, métodos de extracción, protocolo, estandarización, primers, PCR, canino.

Abstract

Canine Ehrlichiosis or Canine Monocytic Ehrlichiosis (CMD) is a tick-borne disease that affects both wild and domestic canines. Its etiological agent is *Ehrlichia canis*, a Rickettsia belonging to the Anaplasmataceae family. This multisystemic disease affects all canines regardless of race, age, or sex, and in most cases, it can be fatal. It is transmitted by the vector *Rhipicephalus sanguineus*, a soft tick belonging to the Ixodidae family that is usually found in warm or tropical climates distributed around the world.

The present work was carried out by collecting blood samples obtained from 33 patients from different veterinary clinics in the cities of Cúcuta and Pamplona, Norte de Santander. These presented associated symptoms or suspicion of CME or had a positive or negative immunochromatography test and/or presence of ticks.

Initially, the DNA extraction of each one of the samples was carried out using the phenol-chloroform method, upon DNA quantification an average of 20 ng/ul was obtained. For the PCR assembly, the subsequently described ECC and ECB primers were used and the PCR conditions were adapted in the laboratory, obtaining a 500 bp amplification in 28 of the samples studied and 5 negative samples.

This work constitutes the first molecular diagnostic approach to *E. canis* in CEDIMOL and will be the basis for subsequent studies.

Keywords: *Ehrlichia*, extraction methods, protocol, standardization, primers, PCR, canine.

Capítulo I

1.1 Planteamiento del Problema

La Ehrlichiosis Canina, conocida también como Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC), hace parte de las enfermedades transmitidas por garrapatas. Es una enfermedad multisistémica causada por una bacteria del género *Rickettsiae*, *Ehrlichia canis*, la cual puede afectar a caninos de todas las razas, no presenta predilección de edad o género y presenta una alta tasa de morbilidad. (López & Soler, 2020). En algunos individuos la enfermedad puede llegar a ser aguda y llegar a recuperarse en algunos meses o años, sin embargo, la enfermedad eventualmente llegará a una fase crónica donde la tasa de mortalidad es elevada.

El vector principal de esta enfermedad es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, también conocida como la garrapata marrón del perro, la cual es de distribución mundial y de alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, gracias a las condiciones climáticas que permiten su adaptación y favorecen su actividad durante todo el año, facilitando así la transmisión de la *Ehrlichia*. (Gómez, Gonzáles & Parra, 2021)

Actualmente *Ehrlichia canis*, ha sido objeto de estudio alrededor de todo el mundo debido a que se han reportado casos de ehrlichiosis en humanos. En el año 1996 se realizó un

estudio en un humano asintomático, donde se aisló y se hizo una caracterización molecular, pero no se había tomado en cuenta como un patógeno de importancia (Gutiérrez, Pérez, & Agrela, 2016). Seguido a esto el estudio realizado por Pérez et al (2006), a un total de 20 personas que presentaban signos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Humana, fueron objeto de estudio, dando como resultado que el 30% de los pacientes fueron positivos para *E. canis*. desde entonces, se ha venido considerando como un patógeno de interés en salud pública, donde la infección se daría de forma accidental al ser humano.

En Colombia, *Ehrlichia canis* ha sido reportada desde hace más de 30 años en regiones tropicales y subtropicales, en altitudes entre los 0 y los 2600 msnm, aunque actualmente se ha tenido registro de la presencia de las garrapatas en altitudes mucho mayores, debido al cambio climático y a la globalización, convirtiéndola en una enfermedad de interés y de mayor estudio para identificar su impacto en las diferentes regiones tanto en humanos como en animales. (López, 2021)

En la región caribe se ha confirmado la presencia de *E. canis* en departamentos como Córdoba, mediante secuenciación de ADN. En ciudades como Barranquilla, se ha reportado una seroprevalencia de 74-83% (McCown et al., 2014), Cali con un reporte de seroprevalencia del 49.5% mediante técnica ELISA, Medellín con frecuencia de positividad del 11.2% en pacientes evaluados con técnicas moleculares y ciudades como Villavicencio, Bogotá y Bucaramanga con el 40% de positividad en pacientes diagnosticados mediante PCR. (López & Soler, 2020)

En nuestro país la presencia del vector *Rhipicephalus sanguineus*, que afectan a los caninos, hacen que las enfermedades que pueda transmitir dicho vector deban ser considerada en

las zonas donde esté presente el vector y donde la enfermedad haya sido diagnosticada con anterioridad.

1.2 Justificación

La EMC es una enfermedad emergente, que debido a la distribución mundial del vector y su capacidad de adaptación se ha convertido en una problemática de interés veterinario.

En nuestro país la presencia de garrapatas se ha relacionado con la variedad de climas en especial regiones que presentan climas cálidos, la presencia abundante de fauna y flora y en general factores que han permitido la adaptación y presencia de este vector, facilitando su contacto con animales de compañía y el ser humano.

Actualmente la EMC es una enfermedad que puede ser detectada mediante el uso de pruebas rápidas basadas en la Inmunocromatografía, pero estas deben ser complementadas con el examen clínico del paciente y/o alguna otra técnica complementaria. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar técnicas moleculares de alta especificidad y sensibilidad tales como la PCR permitiendo un diagnóstico efectivo, rápido y confiable, brindándole al médico veterinario una herramienta que le permita actuar con certeza frente a esta enfermedad cada vez es más común en nuestro medio.

Hernandes et al (2012), reportaron que en nuestro país el diagnóstico de enfermedades como *E. canis*, se realiza mayormente basándose en el examen clínico, historia de contacto con el vector y la observación mediante el extendido de sangre periférica. Desafortunadamente el uso de este tipo de métodos es poco específico y poco confiable, haciendo necesario el uso de herramientas diagnósticas, como complemento.

Dentro de las pruebas más utilizadas en nuestro medio se encuentra el extendido de sangre periférica con tinción de Giemsa o Wright que permite la observación de inclusiones intracitoplasmáticas, pero su principal desventaja es que solo es un 60% efectivo y solo se podrán observar entre los 4 – 8 días después de la infección y no se podrá identificar el patógeno. (Sainz et al ,2015)

Pruebas como ELISA e IFI, siendo esta última considerada como la prueba “Gold standard”, funcionan muy bien en la detección de anticuerpos, aunque estas sean de mayor confianza entre los 7 y 28 días postinfección, haciendo difícil reconocer el estado de la enfermedad y se puede presentar una reacción cruzada con otros microorganismos, generando falsos positivos.

Debido a esto, el uso de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o la PCR en tiempo real (qPCR), al ser métodos de mayor especificidad y sensibilidad, permiten la detección de *E. canis* en pacientes que se encuentren en cualquiera de las etapas de la enfermedad, siendo esta su principal ventaja, así como la caracterización y diferenciación de la especie de *Ehrlichia canis*, sin generar reacciones cruzadas con otros microorganismos que también pueden ser detectados mediante la aplicación de estos métodos.

Es por esto que este estudio pretende demostrar la presencia o ausencia de *Ehrlichia canis* en pacientes que anteriormente han sido diagnosticados con la enfermedad, mediante los métodos tradicionales y en pacientes que han sido reportados como sospechosos, solo con exámenes clínicos o métodos tradicionales como el extendido de sangre periférica, estableciendo así la capacidad y la importancia de la aplicación de las pruebas moleculares como la PCR para el diagnóstico acertado de las enfermedades de interés veterinario.

1.3 Objetivos

1.3.1. *Objetivo general*

Desarrollar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *E. canis* en muestras sanguíneas de perros.

1.3.2. *Objetivos específicos*

- Obtener muestras de sangre de caninos sospechosos o previamente diagnosticados a *E. canis*
- Estandarizar la técnica de extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras sanguíneas
- Estandarizar la técnica de PCR de punto final para la determinación de la presencia de *E. canis* en una población afectada por la enfermedad.
- Relacionar los hallazgos moleculares con la clínica de animales enfermos.

Capítulo II

2.1 Introducción

La PCR como método diagnóstico en medicina veterinaria ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de distintas enfermedades como la EMC, distemper, parvovirus, tuberculosis, entre otras. La PCR fue creada en 1983 por el Dr. Kary Mullis, quien desarrolló esta técnica con el objetivo de sintetizar una gran cantidad de fragmentos del ADN sin tener que realizar clonación del mismo. Aunque en sus inicios estos experimentos solían ser costosos y complicados, hoy en día la PCR se ha convertido en una técnica fácil, rápida y en una de las herramientas más usadas en el diagnóstico de enfermedades en la clínica de pequeños animales (Rodríguez & Barrera, 2004)

Actualmente en el ámbito clínico la PCR permite el diagnóstico adecuado de distintas enfermedades de tipo infeccioso que comúnmente se encuentran en nuestro medio, es por esto que el diagnóstico rápido y acertado se convierte en un punto fundamental para sugerir tratamientos y salvaguardar tanto la salud de los pacientes y la salud pública en general.

Es por esto que en el presente trabajo se propone la PCR como método de diagnóstico complementario para la EMC, una enfermedad muy común en nuestro entorno y que muchas veces el diagnóstico basado en síntomas o alteraciones en el cuadro hemático, termina siendo poco certero.

El laboratorio CEDIMOL, gracias al desarrollo en el área de la biología molecular, ha permitido estandarizar técnicas de diagnóstico por PCR para enfermedades como EMC, parvovirus y próximamente distemper canino, contribuyendo en gran medida a la clínica de pequeños animales en la región.

2.2. Revisión Bibliográfica

2.2.1 Etiología

Ehrlichia spp. es un patógeno intracelular obligado que afecta a muchas especies de mamíferos alrededor del mundo. Pertenece al orden de la Rickettsiales y a la familia *Anaplasmataceae*. Este microorganismo se describe como una estructura de forma cocoide, con un tamaño que oscila entre los 0,2 a 0,5 mm de diámetro y presenta tropismo por células sanguíneas como lo son leucocitos (macrófagos y monocitos) y plaquetas. (Ramkant, Kumar, Verma & Diwakar, 2020), invadiendo su citoplasma, formando vacuolas, donde se multiplica por fisión binaria, formando lo que comúnmente se conoce como las “mórulas”. (Tamí & gutierr, 2004)

Dentro de su clasificación taxonómica, este patógeno ha experimentado diversas modificaciones debido a la cantidad de estudios que se han llevado a cabo. En un principio el género *Ehrlichia* incluía 10 especies que se clasifican según el tipo de célula que parasitaba en el huésped (Tabla 1). (López, 2021)

Tabla 1

Antigua clasificación del género Ehrlichia spp

Monocitos	Granulocitos	Trombocitos
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia equi</i>	<i>Ehrlichia platys</i>
<i>Ehrlichia risticii</i>	<i>E. phagocytophila</i>	
<i>Ehrlichia sennetsu</i>		

Nota. Antigua clasificación del género *Ehrlichia spp*, según la célula a la que infecta. **Fuente.** *Elaboración propia.*

Tiempo después se llevó a cabo una recategorización del género, gracias a estudios basados en el gen 16S de rRNA y varias proteínas, que permitieron una recategorización en 5 especies:

Ehrlichia canis, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* y *Ehrlichia ruminantium* y los microorganismos restantes de la clasificación anterior fueron reclasificados en el género *Anaplasma* y *Neorickettsia*. (Dumler et al., 2001)

Ehrlichia canis, es considerada como el agente etiológico de la EMC, enfermedad propia de la familia *Canidae*, entre ellos, perros, lobos, zorros. Es una enfermedad sistémica, considerada grave que puede llegar a causar la muerte del animal infectado. No presenta predilección por sexo, raza o edad. (Gutiérrez, Pérez, & Agrela, 2016)

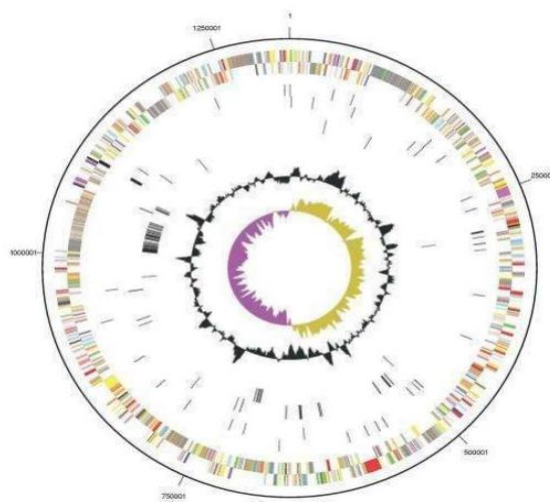
Fue identificada por primera vez en Argelia en el año 1935, aunque no era considerada como una enfermedad de interés hasta que se le atribuyó la muerte de unos soldados en la guerra

de vietnam que habían tenido contacto con perros enfermos. (Viera et al, 2011) y para el año 1987, despertó el interés de la comunidad científica gracias a la aparición de una cepa que presentaba un 98,2% de similitud con la *Ehrlichia canis* y que afectaba a los humanos, conocida como *Ehrlichia chaffeensis*. (Waner, Strenger, Keysary, 2000).

En cuanto a su estructura *Ehrlichia canis*. Microorganismo Gram negativo, presenta un cromosoma circular simple, que contiene aproximadamente 1.315.030 nucleótidos. Se considera que su genoma es más pequeño que el de otros géneros de *Ehrlichia*, pero aun así se ha reportado la presencia de aproximadamente 984 genes siendo los más estudiados: rRNA 5S, 16S y 23S. (Figura 1).

Figura 1

Representación del genoma de Ehrlichia canis



Nota. Representación del genoma de *Ehrlichia canis*. Adaptado de Circular representation of the genome of *E. canis* (P. 4017), por Mavromatis et al, 2006. *Journal of Bacteriology* 118 (11).

Es una bacteria perteneciente al orden *Rickettsiae* y a la familia *Anaplasmataceae*. (Tabla 2)

Tabla 2*Clasificación taxonómica de Ehrlichia canis*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	A- Proteobacteria
Orden	<i>Rickettsiae</i>
Familia	<i>Anaplasmataceae</i>
Género	<i>Ehrlichia</i>
Especie	<i>Ehrlichia canis</i>

Nota. Adaptado de NCBI Taxonomy (2019).

2.2.2 Epidemiología

Ehrlichia canis es un patógeno que presenta distribución mundial, pero su prevalencia es mucho mayor en las regiones tropicales y subtropicales.

Para nuestro país *E. canis*, se ha reportado en altitudes entre los 0 y 2600 metros sobre el nivel del mar (msnm), sin embargo, se ha detectado su presencia en altitudes superiores a los 2600 msnm, lo cual se atribuye a diversos factores que han favorecido su expansión por todo el territorio. (López, 2021)

Este microorganismo se transmite mediante un artrópodo que actúa como vector, *Rhipicephalus sanguineus*, una garrapata de la familia *Ixodidae*. Esta garrapata requiere de 3 hospedadores para desarrollar su ciclo de vida, siendo el perro su hospedador definitivo.

El ciclo de vida de *R. sanguineus*, presenta 3 estadios: larva, ninfa y adultas. Su ciclo inicia una vez eclosionan los huevos y posterior a 6 días, se convierten en larvas. Durante este periodo la larva se alimenta de la sangre de su hospedador durante 10 días hasta que caen al suelo y luego de 15 días, se convierten en ninfas, las cuales van a alimentarse de su hospedador durante otros 11 días, para después dejarlo y realizar la muda nuevamente. Luego de 63 días, si

las condiciones son favorables, se convierten en machos y hembras adultos, los cuales estarán en la capacidad de parasitar a un nuevo hospedador y reproducirse. Una vez la hembra se ha alimentado y ha sido fecundada, cae al suelo para realizar la postura de los huevos durante 3 meses y dando inicio a un nuevo ciclo.

A nivel mundial se han caracterizado más de 800 especies de garrapatas, dentro de las que se encuentran las garrapatas de la familia *Ixodidae*, donde las garrapatas *Amblyomma* y *Rhipicephalus sanguineus*, son de gran importancia en la transmisión de patógenos en los caninos. Según lo reportado por estudios como el de Wu, T & Huang en 2009, la garrapata *R. sanguineus*, ha sido capaz de realizar una adaptación a nuevos ámbitos, esto debido a factores como la movilización de los caninos junto con la migración del hombre, el cambio climático y la modificación del entorno.

Un estudio realizado en Bogotá se llevó a cabo para determinar qué tipo de garrapatas estaban presentes en los caninos de esta área. Se recolectaron garrapatas en consulta, con el criterio de que los propietarios demostraran su estancia permanente en la ciudad. Un total de 799 perros, se recolectó un total de 34 garrapatas (4,25%), donde 22 fueron *Rhipicephalus sanguineus*. La principal recolección se dio entre los meses de enero y junio con promedios de temperatura entre 14,28°C y 21,3°C. (Guerrero, 2016)

En América Latina, la Ehrlichiosis canina presenta un rango de prevalencia que va desde los 0,8% hasta 82,5%, según lo reportado por Castro, González & Rincón (2016)

En países como Perú, estudios han revelado la prevalencia de hemoparásitos, donde el 11,43% han mostrado un resultado positivo mediante el método de tinción de Giemsa. Para el caso preciso de *E. canis*, se reportó que el 56,25% fueron positivos, demostrando que, este

patógeno posee una mayor prevalencia respecto a otros hemoparásitos, teniendo en cuenta factores como estilo de vida, infestación por garrapatas, estado de salud del individuo, edad y tipo de alimentación, donde se determinó que el estado de salud del animal, estuvo mayormente relacionado con un resultado positivo con un porcentaje del 63,9% (Guerrero, 2016)

El factor edad, se encuentra estrechamente relacionado, esto se demuestra en un estudio realizado en el Hospital de Enseñanza Veterinaria de la Universidad Estadual de Londrina, en el sur de Brasil, de un total de 381 individuos, 87 (22%) fueron positivos para *E. canis*, acreditando como grupo de mayor riesgo a los perros mayores de 1 año, previamente expuestos a la garrapata a diferencia de los cachorros o animales más jóvenes que, presentan una mayor capacidad de respuesta inmune. (Trapp et al, 2006)

En Colombia, la enfermedad ha sido reportada desde aproximadamente hace 30 años, en lugares donde hay mayor presencia de los vectores *R. sanguineus* y *Amblyomma cajennense*. Este vector, se considera endémico de los Estados Unidos y se cree que su ingreso al país proviene de Europa. Se han considerado 2 linajes, el linaje sur, que corresponde a climas templados, en países como Argentina o Chile y el linaje norte, que son especies de clima cálido, Brasil, África y Colombia. (López, 2021)

Pocos estudios se han realizado en Colombia sobre cómo se encuentra el estado de esta enfermedad. En Córdoba, se reportó la presencia de *E. canis* en 20 de 74 perros sospechosos (27,0%), mediante tinción de Wright. En Cali se encontró que hay una seropositividad del 49,5%, diagnosticado mediante ELISA. (Silva et al 2008)

Un estudio realizado en mayo del 2004 a mayo del 2005, examinó muestras para detectar anticuerpos contra *E. canis* mediante el uso de un test comercial ELISA. Se tuvo en cuenta la

raza, edad y sexo. Como resultado se obtuvo un 49,5% de muestras positivas donde de las 32 razas analizadas el labrador predominó con el 15,8%, poodle (10,9%), Bóxer (8,9%) y Schnauzer (7,9%). El 59,4% adultos, 14,9% seniles y 4% cachorros, demostrando una vez más que el factor edad se encuentra más relacionado a la infección por *E. canis*. (Silva, et al. 2008).

Un estudio realizado por Cartagena et al (2015), demostró que razas como Cocker spaniel, lobo siberiano, Pug y Labrador presentaban seroprevalencias mayores entre el 36% al 48%, especialmente en adultos y seniles, llegando a la conclusión que, identificar a perros con estas condiciones, es de importancia ya que pueden llegar a estar más predispuestos y por ende tener un mayor riesgo si no se realiza un diagnóstico adecuado.

La caracterización molecular de *E. canis* se ha logrado gracias a la presencia de genes que se han conservado como el gen 16S r RNA, *dsb* y otras proteínas inmunorreactivas como la familia OMP-1 donde se encuentran la proteína (p28 y p30) aunque varios estudios han demostrado que un gen específico, provee mayor información acerca de la diversidad genética de *E. canis* y puede ser usado en su genotipificación. A este gen se le conoce como *TRP 36* (*Tandem Repeat Protein*). (Arroyave et al, 2020)

Gracias a este gen se han podido identificar 4 genogrupos de *E. canis* alrededor del mundo: (1) Estados Unidos (US), este genogrupo ha sido identificado en Norte América, Brasil, Nigeria, España, entre otros. (2) Taiwán (TWN) que principalmente ha sido identificado en Sudáfrica, Tailandia, Turquía y Taiwán. (3) Brasil (BR) identificado a lo largo de este país y más recientemente en Turquía y (4) Costa Rica (CR) que se detectó en dicho país, en humanos donantes de sangre. (Arroyave et al, 2020)

En el año 2022 un estudio realizado por Gonzales et al. descubrió la presencia de un nuevo genogrupo de *E. canis* en Cuba, donde se recolectaron muestras de 8 perros infectados naturalmente. 4 de los perros presentaron una diferencia filogenética bastante notoria respecto a los genotipos ya conocidos y probablemente por una modificación que la hacía más virulenta, llegando a la conclusión de que habían descubierto un nuevo genotipo (CB).

Se sabe que, en nuestro país, pocos estudios han sido llevados a cabo para la identificación de los genogrupos que circulan en el territorio, sin embargo, el primero estudio llevado a cabo por Arroyave et al, 2020, en Medellín, demostró la presencia de los genogrupos US, CR y BR.

Con estos estudios se demuestra que los perros al ser hospedadores definitivos de la garrapata que transmite *E. canis*, el aumento de la población canina en distintos lugares del mundo, y en nuestro país, (donde la población hasta el año 2015 era de 4.500.000), ocasionan la presencia de problemas de salud y la fácil propagación de enfermedades, generando un problema de salud pública.

2.2.3 Fisiopatología

Una vez la garrapata se ha alimentado de la sangre de un perro infectado con *E. canis*, este patógeno se aloja en las glándulas salivales de la garrapata y sus secreciones una vez entran en contacto con el sitio de picadura, causan la contaminación. Esto se debe a que la saliva de la garrapata contiene una gran cantidad de antiinflamatorios, anticoagulantes e inmunoreguladores que facilitan la entrada del patógeno al hospedador. (Hajdušek et al, 2013)

Una vez en el hospedador *E. canis* se disemina vía sanguínea o vía linfática, infectando células mononucleares o plaquetas alcanzando órganos blancos como bazo, hígado, médula ósea,

riñones y en ocasiones meninges y pulmones. Al no ser destruido por los fagocitos y macrófagos, gracias a sus mecanismos de evasión, *E. canis* empieza a crecer y a multiplicarse dentro de la célula, invadiendo un lado de la célula donde forman mórulas dentro de las vacuolas. Una vez en la célula comienza a interferir con distintos procesos celulares e incluso con la apoptosis. (Castro et al, 2016).

El periodo de incubación es de 8 a 20 días y la enfermedad presenta 3 fases: aguda, subclínica y crónica. Una vez se disemina a los órganos diana, se adhieren al endotelio vascular donde se produce vasculitis e infección en el tejido subendotelial.

Inicialmente, la enfermedad se da como un proceso agudo donde se presenta depresión, anorexia, anemia, fiebre o en general, sintomatología poco específica. Esta fase, ocurre entre la segunda y tercera semana después de la infección, con una duración entre 14 y 24 días. El microorganismo se multiplica en las células mononucleares. En los hallazgos hematológicos, se presenta trombocitopenia, anemia y leucopenia leve o moderada. En esta fase la trombocitopenia es atribuida al consumo plaquetario debido a procesos inflamatorios (vasculitis), secuestro de plaquetas en el bazo o disminución de la vida media de las plaquetas debido a lesiones. (Cadavid, Franco & Morales, 2012)

Seguido a esto, aparece la fase subclínica, puede llegar a permanecer hasta 5 años, se puede eliminar el agente, pero en ocasiones permanecen latentes en las células infectadas. Según Liu et al (2011), Esto ocurre debido a que las mitocondrias, rodean las mórulas producidas por *Ehrlichia*, y esta inhibe el metabolismo de la mitocondria, estabilizando la permeabilidad de la membrana y poniéndolo en estado latente. Esta fase ocurre después de 6 o 9 semanas, y sus

sistemas son similares a la fase aguda con algunas complicaciones y aumento de plaquetas.

(López, 2021)

Finalmente, la fase crónica de la enfermedad puede llegar a causar daños en la médula ósea, interferir en la hematopoyesis y causarle la muerte al animal, si no se trata a tiempo. La trombocitopenia sucede en episodios de 3-4 días y a intervalos de 7-21 días. (López, 2021). Se caracteriza porque los signos clínicos se manifiestan de forma recurrente y se presenta pancitopenia y la forma más severa es donde se produce la muerte, normalmente debido a sangrados prolongados. (Gutiérrez et al, 2016).

En esta etapa avanzada de la enfermedad, se pueden presentar infiltrados mononucleares en vísceras, ojos y medula ósea, donde se pueden observar células infectadas y se pueden expresar en una hipergammaglobulinemia. Se presenta destrucción de glóbulos blancos, consumo de plaquetas por agregación, dando como resultado la aparición de pancitopenia que en esta fase se presenta junto con la supresión de la medula ósea. (Tizard, 1996)

Los signos neurológicos, aunque no se consideran frecuentes, se considera que son causados por inflamación a nivel del sistema nervioso central (SNC), hemorragias, infiltración celular o compresión de las meninges. Normalmente se observa cuadros con ataxia, tetraparesia, xifosis, déficit a nivel de nervios craneales y convulsiones. (Guerrero, 2016)

Otra de las alteraciones es la nefropatía, donde ocurre una gran pérdida de proteínas, debido a la glomerulonefritis, es decir provoca una proteinuria que se puede evidenciar en otro síntoma común en la EMC, los edemas en la parte ventral del cuerpo.

En la Tabla 3 se puede evidenciar como se manifiestan los signos clínica durante las diferentes fases de la enfermedad.

Tabla 3*Signos clínicos en las diferentes fases de la Ehrlichiosis canina.*

Fase	Manifestación	Duración	Signos clínicos
Aguda	Semana 2 -3 después de la infección	Entre 14 y 24 días	Normalmente se presentan signos inespecíficos y leves. • Trombocitopenia • Anemia leve • Leucocitosis • Fiebre • Anorexia • Letargia • Organomegalia
Subclínica	Semana 6 – 8 después de la infección	1 mes hasta 5 años	Se presentan signos similares a la fase aguda • Trombocitopenia • Leucopenia • Fiebre
Crónica	Ocurre después de la semana 8, si la enfermedad no se resuelve.	Su duración puede ser hasta años o causar la muerte	• Hemorragias • Trombocitopenia • Signos neurológicos • Uveítis • Ceguera • Nefropatía • Muerte

Fuente. *Elaboración propia*

Para el tratamiento de EMC, actualmente se sigue dando uso a la doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg, 1 vez al día durante 4 semanas, mostrando una mejoría en los pacientes, pero no la resolución completa de la enfermedad. (Gaitán, 2021)

En un estudio realizado por Jenkins et al 2018, se menciona la minociclina, usada a una dosis de 10 mg/kg 1 vez al día en 5 perros positivos a *E. canis*, dando como resultado una mejoría en 5/5 perros, lo que sugiere a este fármaco como un tratamiento prometedor.

Adicional a esto, diversos autores reportan que, el tratamiento de soporte es necesario para mantener el estado fisiológico del animal, tales como transfusiones sanguíneas, reposición de electrolitos entre otros. Además, el uso de tratamientos de apoyo como antiinflamatorios, hemoderivados y el control de la garrapata. (Gómez, González & Parra, 2021)

2.2.4 Métodos diagnósticos

A través del tiempo, la EMC. ha sido diagnosticada mediante distintos métodos que se han ido desarrollando para ser cada vez más precisos. Diferentes tipos de pruebas con grados variables de sensibilidad y especificidad se han aplicado, para detectar la presencia de este patógeno. Se debe tener en cuenta que presenta distintas fases y manifestaciones clínicas, por lo tanto, su diagnóstico puede variar dependiendo de la fase en la que se encuentre.

Dentro de los métodos diagnósticos que han sido descritos y que se usan con frecuencia en la actualidad se encuentran: microscopia directa, hemoleucograma, pruebas serológicas tales como la Inmunofluorescencia indirecta, ELISA y pruebas moleculares como PCR.

Frotis sanguíneo. Es un método rápido, sencillo y económico en la práctica diaria, pero definitivamente no es específico y es el método menos sensible que existe para la detección de *E. canis*. Se realiza una tinción de Giemsa o Diff Quick en una muestra de sangre periférica. Si bien se pueden observar las inclusiones en la fase aguda de la enfermedad, estas pueden no estar relacionadas con el patógeno o incluso no llegar a observarse por la baja tasa de infección celular. (Carrillo et al, 2012)

Hemoleucograma. El objetivo es analizar las diferentes células sanguíneas de forma cualitativa y cuantitativa. El principal hallazgo es la trombocitopenia que puede permanecer durante todas las fases de la enfermedad. Así mismo se puede observar leucopenia, anemia

normocítica normocrómica no regenerativa, pancitopenia en fases más crónicas, lo cual puede indicar una aplasia medular. Siendo el hallazgo más común la trombocitopenia en un 90% de los casos.

Inmunofluorescencia indirecta. Indirect Immunofluorescence Assay, por sus siglas en inglés, es considerada la técnica “Gold Estándar” para el diagnóstico de la EMC. Básicamente consiste en la detección de anticuerpos IgG mediante inmunofluorescencia. Se recomienda hacerlo en la fase aguda de la enfermedad y se debe tener en cuenta que estos anticuerpos pueden permanecer por meses o incluso pueden llegar a presentar seropositividad hasta después de 28 días de que ocurrió la infección, por lo que es recomendable repetirla a las 2 o 3 semanas. (Walker & Dummer, 1996 citado en Gaitán 2021)

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Esta técnica se basa en la detección de IgG, es uno de los métodos más usados en la práctica clínica. El test más comúnmente utilizado para la detección de hemoparásitos en el SNAP 4DX plus, pero a igual que la IFI presenta desventajas a la hora de detectar la presencia de *E. canis*. (Gaitán, 2021)

2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción de tipo enzimática que lleva a cabo *in vitro* que consiste en la amplificación de una secuencia de ADN específica, millones de veces durante varios ciclos, obteniendo la copia exacta de la secuencia de ADN blanco. Esta reacción utiliza la actividad de la ADN polimerasa, enzima que en su estado natural es capaz de sintetizar el ADN en las células. (Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013)

Dentro de los elementos mencionados por Tamy de Dios et al, 2013 para llevar a cabo esta reacción, se encuentran: el ADN molde, Taq polimerasa, primers, dNTP's, MgCl₂, buffer, H₂O a grado molecular.

ADN molde. En la PCR, las cadenas de ADN que se separan durante la reacción se conocen como templado o molde y son usadas para que la enzima realice la síntesis de las nuevas cadenas que llevan la secuencia de interés.

Taq polimerasa. La enzima catalizadora de la reacción a nivel celular es conocida como la ADN polimerasa. Enzima que sintetiza el ADN. En el caso de la PCR se utiliza una enzima llamada Taq ADN polimerasa, proveniente de una bacteria Termófila, lo que le confiere la capacidad de soportar altas temperaturas durante la reacción. Esta enzima normalmente se vende comercialmente y son muy eficientes.

Primers. Estos son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia que se desea amplificar y a su vez son complementarios. Normalmente su tamaño va desde los 20 hasta los 30 pares de bases. La cantidad de G-C, no deben exceder más del 55% de su composición debido a que la presencia de su triple enlace alteraría la temperatura a la que se debe llevar a cabo la reacción.

En la PCR se utilizan 2 secuencias específicas de primers una denominada "*Forward*" y otra denominada "*Reward*", ambas diseñadas pensando en la hibridación con las cadenas molde del DNA y poder ser extendidas por la Taq Polimerasa.

dNTP's. Son las bases nitrogenadas con las que la polimerasa va a construir las nuevas cadenas de ADN y ayudan a que la reacción sea más específica.

Buffer. Solución amortiguadora generalmente compuesta de Tris-HCL, con un PH:8 y una concentración final de 1X.

Magnesio (MgCl₂). Es el cofactor enzimático que contribuye a la especificidad de la reacción, su concentración debe estar entre 0.5 y 2.5 mM.

H2O. El agua utilizada en este tipo de reacciones debe ser a grado molecular, es decir, está en su forma destilada libre de nucleasas, las cuales degradan los ácidos nucleicos.

Para llegar a realizar el procedimiento de la PCR primero se deben realizar una serie de pasos para la preparación y procesamiento de la muestra.

Colecta de la muestra. Este paso es de gran importancia debido a que una colecta y un manejo adecuado de la muestra, van a permitir una extracción satisfactoria. Es decir, se puede obtener un ADN integro, sin contaminantes que puedan llegar a afectar la PCR. Para esto es necesario tener en cuenta que, dependiendo del tejido, las condiciones de almacenamiento serán diferentes. (Alejos, Aragón y Cornejo, 2014).

Lisis de eritrocitos. Este proceso se realiza en primera instancia con el objetivo de eliminar los eritrocitos, los cuales, al contener hemoglobina, pueden llegar a inhibir la PCR. El objetivo de esto es obtener la mayor concentración de glóbulos blancos posibles mediante lavados con un buffer de lisis de glóbulos rojos. Esto se realiza mediante varios ciclos de lavados (con la solución de lisis) y ciclos de centrifugado a 12.000 rpm durante 10 minutos.

Extracción de ADN. Durante este proceso, ocurre una modificación o destrucción de las moléculas que forman la pared celular, para así liberar los ácidos nucleicos. Normalmente son utilizadas soluciones básicas o detergentes para disolver la membrana celular y también

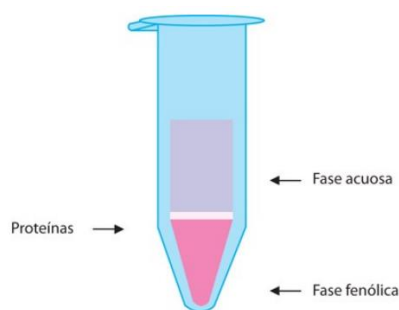
inhibidores que permiten inactivar las enzimas que degradan el ADN. (Sandoval, Martínez y López, 2013)

Método fenol- cloroformo. Es la técnica más usada por ser económica y fiable en cuanto a la obtención de ADN de buena calidad. Las muestras utilizadas, deben estar refrigeradas (4°C).

Este proceso esta a su vez conformado por 3 fases. Separación de proteínas y lípidos. En esta fase el ADN que se obtuvo en el proceso de lisis de eritrocitos, se separa de las proteínas y los lípidos que aún se encuentran en la muestra. Esto se verá reflejado en la formación de 2 fases, una fase orgánica (proteínas y lípidos) y una fase acuosa (Figura 2). Se realiza mediante el uso de solventes que en su respectivo orden son el fenol, el fenol -cloroformo- alcohol isoamílico. Una vez los solventes son aplicados y las muestras centrifugadas, entre cada ciclo se debe extraer el sobrenadante para así proceder con el siguiente solvente. (Alejos et al, 2014)

Figura 2

Formación de la fase acuosa y la fase orgánica con el método fenol- cloroformo



Nota. Adaptado de Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Por Sandoval, Martínez y Armendáriz, 2013, McGraw Hill

Precipitación de ADN. Una vez se eliminan los lípidos y las proteínas, se obtiene el ADN. En esta fase se utilizan alcoholes, que van a permitir que el ADN se vuelva insoluble debido a que este se pliega sobre sí mismo. En primera instancia se utiliza etanol absoluto y se realiza un proceso de centrifugación, lo que permitirá que el ADN se mantenga en el fondo del tubo y este pueda ser desechado. Luego de esto se adiciona etanol al 70%, que va a permitir la eliminación de residuos y su eliminación se da por evaporación. (Alejos et al, 2014)

Redisolución del ADN. Finalmente, el ADN producto de la extracción debe resuspenderse en una solución. Si se realiza en agua esta agua debe estar libre de contaminantes o se puede utilizar una solución amortiguadora PBS, para almacenarse finalmente a una temperatura de -80°C. (Alejos et al, 2014)

Cuantificación del ADN. Este procedimiento se lleva a cabo con el fin de medir la cantidad del ADN que se extrajo previamente. Se basa principalmente en el paso de un haz de luz a través de moléculas que se encuentran suspendidas. Para el caso de los ácidos nucleicos, su rango de absorción máxima es a una longitud de onda de 260 nm en luz ultravioleta (UV). Para este fin se utiliza un espectrofotómetro que lleva a cabo la medición mediante un fotodetector. (Sandoval, Martínez y López, 2013)

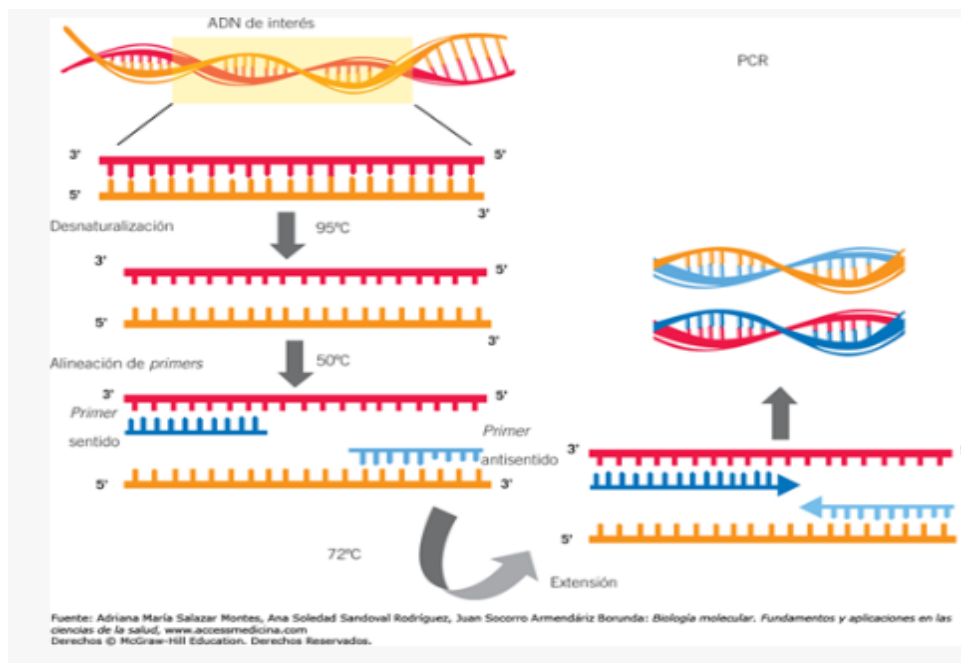
PCR en punto final. Esta técnica se basa en la amplificación del producto y su posterior visualización en gel de agarosa o acrilamida, proceso al que se le conoce como electroforesis y el producto que fue amplificado puede observarse mediante una banda, con una longitud específica que indica un marcador de peso molecular.

La PCR es un procedimiento que se lleva cabo en 3 fases (Figura 3). La primera de ellas conocida como desnaturalización. Aquí las cadenas de ADN se calientan y separan a una

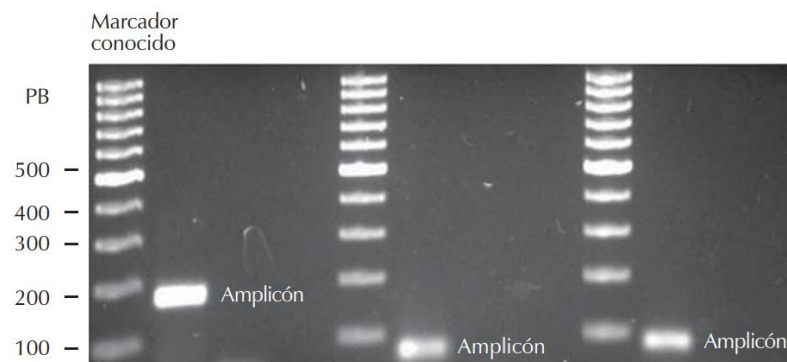
temperatura de 95°C durante 20-30 segundos, obteniendo al final las cadenas de ADN por separado, que serán consideradas como las cadenas molde. Seguido a esto se encuentra la fase de hibridación, en esta fase los primers se alinean con el extremo 3' de la cadena molde y se hibridan con la secuencia complementaria donde la temperatura debe ser optima (entre 50 y 60 °C). Finalmente, en la extensión, entra en acción la Taq polimerasa que cataliza la reacción actuando sobre el complejo molde-primer, agregando los dNTP's, complementando así la cadena de ADN. Se realiza a una temperatura de 72°C y al final del ciclo se obtienen los amplicones. Listos para ser visualizado mediante electroforesis (Figura 4) (Tamay de Dios, 2013)

Figura 3

Etapas de la PCR



Nota. Etapas de desnaturalización, anillamiento y extensión llevadas a cabo en la PCR. Adaptado de Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Por Sandoval, Martínez y Armendáriz, 2013, McGraw Hill

Figura 4*Electroforesis*

Nota. Las bandas representan los productos amplificados de la PCR y presentan tamaños específicos, que son comparadas con marcadores de peso molecular. Adaptado de Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. (P. 74) por Tamay de Dios et al., 2013, Investigación en discapacidad, 2 (2)

PCR en tiempo real. Esta técnica tiene como objetivo la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos utilizando reporteros fluorescentes durante el proceso de la reacción y su fundamento se basa en la PCR de punto final, pero con la diferencia de que, en la PCR en tiempo real, la forma en cómo se detecta y analizan los productos de la reacción cambia completamente. (Tamay de Dios, 2013)

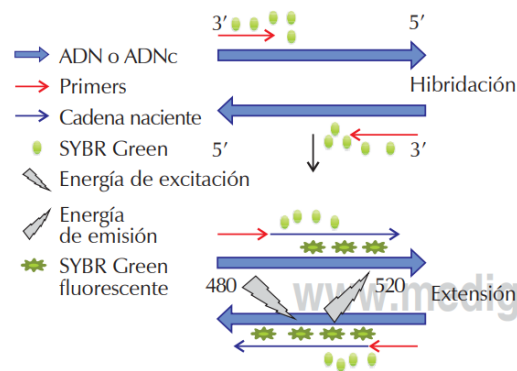
La detección de los productos de la PCR se realiza al tiempo que la amplificación mediante sistemas de detección por fluorescencia. Mediante la detección de la fluorescencia que se libera durante la amplificación, puede medirse la cantidad de ADN que se ha sintetizado, debido a que, la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de productos formados en la PCR. (Sandoval, Floresvillar & Meza, 2013)

Para este fin se utilizan sondas específicas marcadas con fluoróforos, conocidas como sondas TaqMan o agentes intercalantes fluorescentes como el SyberGreen.

SyberGreen. La PCR en tiempo real con SyberGreen (Figura 5), consiste en la unión de esta molécula intercalante al ADN de doble cadena, por el surco menor, donde es excitado a una longitud de onda de 480 nm, produciendo fluorescencia. (Tamay de Dios, 2013)

Figura 5

Reporteros SyberGreen



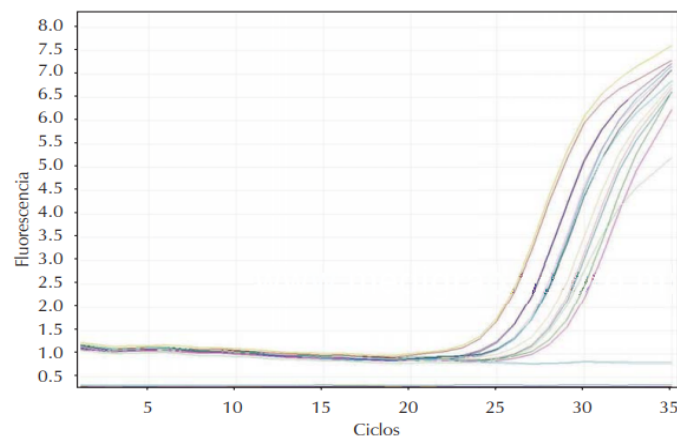
Nota. Mecanismo de acción de los reporteros SyberGreen. Una vez el reporte se une al ADN emite fluorescencia a una longitud de onda de 480 nm. Adaptado de Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. (P. 75) por Tamay de Dios et al., 2013, Investigación en discapacidad, 2 (2)

Sondas TaqMan. Esta PCR implica el uso de una sonda que hibrida en algún punto intermedio de la secuencia franqueada por el par de primers sentido y antisentido. La amplificación de la cadena donde la sonda está unida libera el fluorocromo sólo cuando la sonda es degradada por la acción exonucleasa de la ADN polimerasa, lo que asegura que sólo habrá detección cuando un producto de amplificación haya sido generado. (Sandoval et al, 2013)

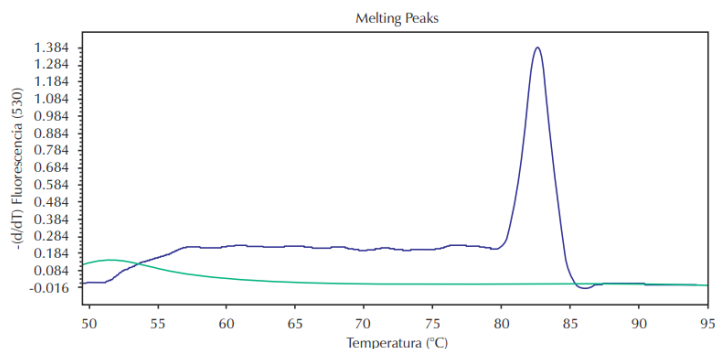
En cuanto al análisis de una PCR en tiempo real, se realiza luego de la detección de la amplificación y la fluorescencia. Los termocicladores, son los equipos utilizados para llevar a cabo los ciclos de amplificación de la PCR. En el caso de una PCR en tiempo real, estos presentan un software, donde se visualiza una serie de graficas que contienen los datos necesarios para el análisis de la reacción y saber si se llevó a cabo con éxito. Una de estas es la curva de amplificación (Figura 6), que brinda información sobre el progreso de la reacción y otra que es la curva de disociación (Figura 7) que brinda información sobre la especificidad de la reacción. (Tamay de Dios, 2013)

Figura 6

Curva de amplificación



Nota. En la figura se puede observar la curva de amplificación que cuenta con un eje Y donde se muestran los niveles de fluorescencia y un eje X donde se muestran los ciclos de la reacción, los cuales indican la amplificación de la reacción, es decir entre más ADN más fluorescencia se detecta. Adaptado de Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. (P. 76) por Tamay de Dios et al., 2013, Investigación en discapacidad, 2 (2)

Figura 7*Curva de disociación*

Nota. El pico de amplificación (línea azul) que se observa corresponde a la curva de disociación, indicando la especificidad de la reacción. La línea verde corresponde al control negativo, es decir no amplifica. Adaptado de Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. (P. 77) por Tamay de Dios et al., 2013, Investigación en discapacidad, 2 (2).

Como se ha venido mencionando a lo largo del presente capítulo, cabe resaltar la importancia del diagnóstico adecuado de enfermedades que afectan especialmente a animales de compañía, este deberá ser oportuno y confiable con el fin de ofrecer tratamientos asertivos y eficientes para salvaguardar la integridad de los pacientes, así como una convivencia sana con sus propietarios. Es por esto que se propone la PCR como un método confiable, que, al ser específico y altamente sensible, puede ser usado como método diagnóstico en la EMC, enfermedad que, por su gran variedad de sintomatología y sus fases poco marcadas, es difícil de diagnosticar a tiempo con los métodos tradicionales, obteniendo falsos negativos o reacciones cruzadas con otros microorganismos.

Capítulo III

3.1. Metodología

3.1.1 Población de estudio

33 perros con signos clínicos compatibles y/o test diagnóstico- positivos o negativos a EMC provenientes de la ciudad de Cúcuta y Pamplona, Norte de Santander fueron incluidos en el estudio entre los meses de febrero a mayo del 2023. Los signos clínicos de los animales de este estudio incluyeron trombocitopenia, anemia no regenerativa, fiebre, anorexia, pérdida de peso, así como historia de exposición a garrapatas. Las edades de los animales oscilaron entre 1 mes y 10 años, y se distribuyeron como 45,4% machos y 54,5% hembras. (Anexo 1)

3.1.2 Recolección y conservación de las Muestras

Se obtuvieron muestras de aproximadamente 3 mL de sangre tomadas de la vena safena, cefálica o yugular en tubos con anticoagulante EDTA. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C, hasta que se realizó el procesamiento de las mismas.

3.1.3 Lisis de Glóbulos rojos

El volumen de sangre utilizado para llevar a cabo el procedimiento fue entre 100 y 300 µL de sangre previamente centrifugada a 4500 rpm durante 10 minutos, con la intención de separar la capa de glóbulos blancos del resto de componentes. Una vez las muestras fueron separadas en tubos Eppendorf se procedió a agregar buffer de lisis de glóbulos rojos (NH₄CL, EDTA y NaHCO₃) en una proporción 1:3, haciendo lavados hasta que la muestra quedó completamente clarificada, centrifugando entre cada lavado durante 10 minutos a 3000 rpm. Finalmente, los glóbulos blancos obtenidos en forma de pellet fueron resuspendidos en 200 µL de PBS.

3.1.4 Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el método Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico.

Al pellet de glóbulos blancos obtenido se agregaron 500 µl de fenol, se mezcló por inversión y se llevó a centrifugar a 12000 rpm durante 6 minutos, la fase acuosa resultante se extrajo y se transfirió a un tubo Eppendorf. Posteriormente se adicionaron 500 µl de fenol cloroformo alcohol isoamílico se mezcló y se llevó a centrifugar a 12000 rpm durante 6 minutos, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregaron 500 µl de cloroformo se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos, la fase acuosa obtenida, se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Seguido se agregaron 500 µl de alcohol absoluto y 20 µl de acetato de sodio, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se adicionaron 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos, el alcohol fue descartado completamente y las muestras permanecieron secándose durante mínimo 2 horas o hasta que el alcohol se evaporó por completo. Una vez secos los tubos se adicionaron 100 µl de buffer de elusión (High Pure PCR Template Preparation Kit Roche ®). Las muestras fueron conservadas a -20 C para su posterior uso.

3.1.5. Cuantificación del ADN

El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría de luz UV a 260 nm, la calidad se analizó utilizando 260/280 y 260/230, obteniéndose la calidad y concentración del mismo, utilizando un espectrofotómetro de luz UV (NanoDrop®.Lite Plus US)

3.1.6 PCR punto final

3.1.6.1. Selección de cebadores. Para el presente estudio se utilizaron los cebadores sugeridos por Dawson et al 1994 ECC Fw (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') y ECB Rw (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'). Se realizó una verificación de estos primers estudiando la secuencia del gen ribosomal 16S de *E. canis* del genotipo Oklahoma en la base de datos GenBank con numero de acceso **M73221.1** utilizando la herramienta Primer 3-BLAST, una vez verificados se pudo determinar que estos amplifican un fragmento de 500 pb en la región 16s de ADNr.

Tabla 4

Secuencia de cebadores utilizados para el diagnóstico de PCR en pacientes sospechosos a EMC.

Nombre del microorganismo	Nombre del Primer	Secuencia	# de bases	Tamaño
	ECC	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'	23	500pb
<i>Erhlichia spp</i>	ECB	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'	21	500 pb

Fuente. *Elaboración propia*

3.1.6.2. Condiciones usadas para la PCR. Las condiciones usadas para la PCR se hicieron siguiendo el protocolo sugerido por Aguirre et al (2004). Se realizaron los cálculos respectivos para llevar a cabo un experimento inicial con 5 muestras positivas diagnosticadas por inmunocromatografía y un control negativo, de la siguiente manera:

Se comienza re suspendiendo los cebadores que se van a utilizar con 250 ul de agua, obteniendo una solución madre de la cual se utilizaron 10 µl y se adicionaron 190 µl de agua libre de nucleasas obteniendo un volumen final de 200 µl de cada cebador. De acuerdo a lo

sugerido por Aguirre et al (2004), los elementos utilizados para la PCR se dan de la siguiente manera: 0,2 uM de cada primer, 200 uM de los deoxi-nucleotidos, 2 mM de MgCl₂ y 1,2 U de polimerasa. Se decide ajustar las cantidades utilizadas para cada uno de los elementos utilizados para llevar a cabo la PCR (Tabla 5), con el objeto de optimizar el proceso se decidió utilizar un master mix, GoTaq® Master Mixes (Promega), a una concentración 2X, que contiene dNTP's, MgCl₂ y Taq polimerasa,

Tabla 5

Elementos utilizados para la PCR

Elemento	Cantidad utilizada
Primer ECC	2,5 ul
Primer ECB	2,5 ul
GoTaq	12,5 ul
Agua libre de nucleasas	2,5 ul
ADN molde (Muestra)	5 ul

Fuente. *Elaboración propia*

Para la PCR se utilizó un termociclador (Applied Biosystems™ Veriti 96 Well Thermal Cycler) utilizando los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial 4 minutos a 95°C, amplificación 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, con extensión final de 5 minutos a 72°C.

3.1.6.3. Electroforesis. La determinación de los amplificados se realizó en un Gel de Agarosa al 2%. Este se preparó utilizando 1.2 gr de agarosa, 60ml de buffer (TBE) Tris Borato

EDTA 0,5X y 3,5 µl de colorante 6x HydraGreen™ Safe Loading Buffer. un marcador de peso molecular GeneRuler 100pb ADN Lader y la electroforesis se puso a correr a 84 voltios. La visualización de los amplificados, se realizó en un transiluminador de luz UV Invitrogen™ safe imager™2.0

3.1.6.4. Análisis de los resultados. Se realizó una correlación de los resultados obtenidos en la PCR con los datos de cada paciente teniendo en cuenta examen clínico, edad y pruebas previas.

Capítulo IV

4.1. Resultados

4.1.1. Extracción de ADN

Durante la extracción de ADN se realizaron diferentes pruebas para lograr la estandarización del método. Inicialmente en la lisis de glóbulos rojos se sugirió centrifugar las muestras antes de realizar el procedimiento, dando como resultado muestras que requerían menos lavados con el buffer de lisis y la obtención de pellets de mayor tamaño. Seguido a esto se sugirió al final del proceso resuspender las muestras e 200 µl de PBS, esto con el fin de obtener una fase acuosa mucho más visible en el procedimiento de extracción y facilitar el mismo, debido a que se utilizaba buffer de elusión haciendo que la fase acuosa no se diferenciara fácilmente.

Para el método fenol cloroformo, primero se realizaron cambios en el protocolo para obtener muestras menos contaminadas, estos cambios consistieron en doble lavado con cloroformo donde no se evidenció cambios en los valores de la calidad del ADN, se realizó doble lavado con etanol al 70%, donde tampoco se evidenció mejora en los resultados y se decide

mantener el protocolo como se sugirió, pero tomando una menor cantidad de fase acuosa en cada paso. Gracias a esto se obtuvo como resultado muestras con una contaminación menor y no se afectó la concentración del ADN.

4.1.2. Cuantificación de ADN

La concentración del ADN obtenido osciló entre 1,4 ng/ul y 205,9 ng/ul, obteniendo un promedio de 20, mientras que las mediciones de calidad del mismo tuvieron un promedio de 1,4 indicando una contaminación con proteínas (Anexo B)

4.1.3. PCR en punto final

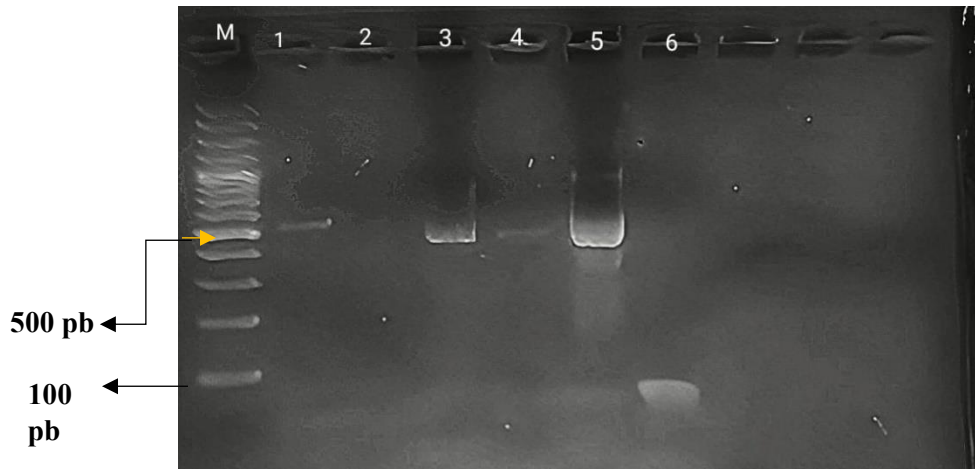
El procedimiento realizado ha sido previamente descrito a detalle. Este se realizó en las 33 muestras recolectadas y previamente diagnosticadas como pacientes positivos a *Ehrlichia canis* mediante test rápido.

Una vez llevado el procedimiento para la PCR se logró amplificar un segmento del gen 16s ARNr de 500 pares de bases (pb) específico para *Ehrlichia canis*. Se realizó una prueba inicial con el objetivo de comprobar la efectividad de los primers y el protocolo, donde se incluyeron las muestras E01, E03, E04, E08, E09 y un control negativo (agua). Como resultado se obtuvo que las muestras E01, E04, E08 y E09 presentaron una amplificación de 500 pb, es decir fueron positivas a *Ehrlichia canis* (Figura 8).

Debido a que no es fácil contar con un cultivo puro de *Ehrlichia canis*, se decidió utilizar como control positivo una muestra en la cual se habían observado inclusiones intracelulares, sintomatología clínica, además contaba con test inmunocromatografía positivo y una gran banda positiva a la PCR.

Figura 8

Amplificación por PCR de las muestras de prueba

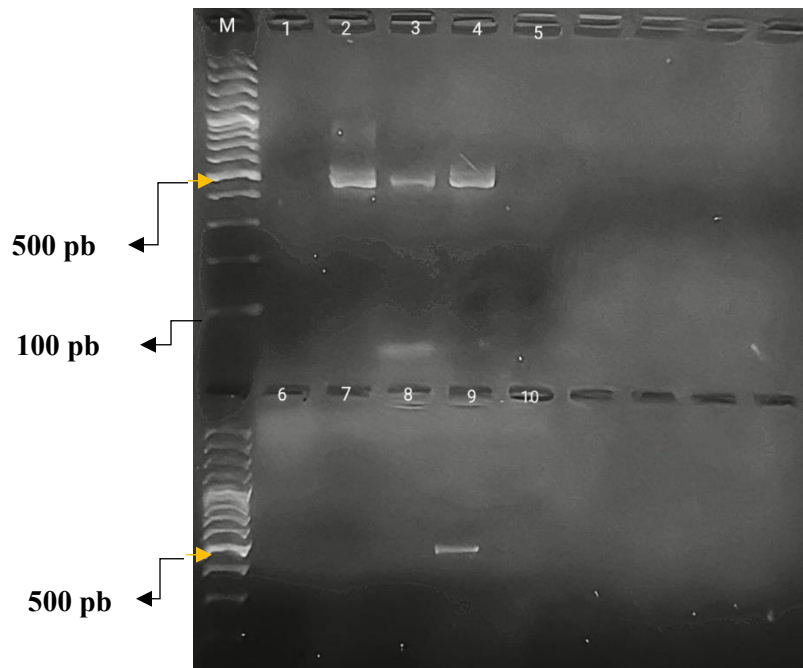


Nota. (M) Marcador de peso molecular. . Muestras E01(1), E04(3), E08(4) y E09(5), positivas a *Ehrlichia canis*. E03(2), muestra negativa a *Ehrlichia canis*. Control negativo (6).

Una vez el protocolo se estandarizó para la detección molecular de *Ehrlichia canis*, se dio inicio al diagnóstico de las muestras recolectadas (Figuras 9, 10, 11). A partir de esto se obtuvo que 5/33 (15,1%) muestras, fueron negativas a la PCR, mientras que 28/33 (84,8%) fueron positivas a la PCR. (Figura 12).

Figura 9

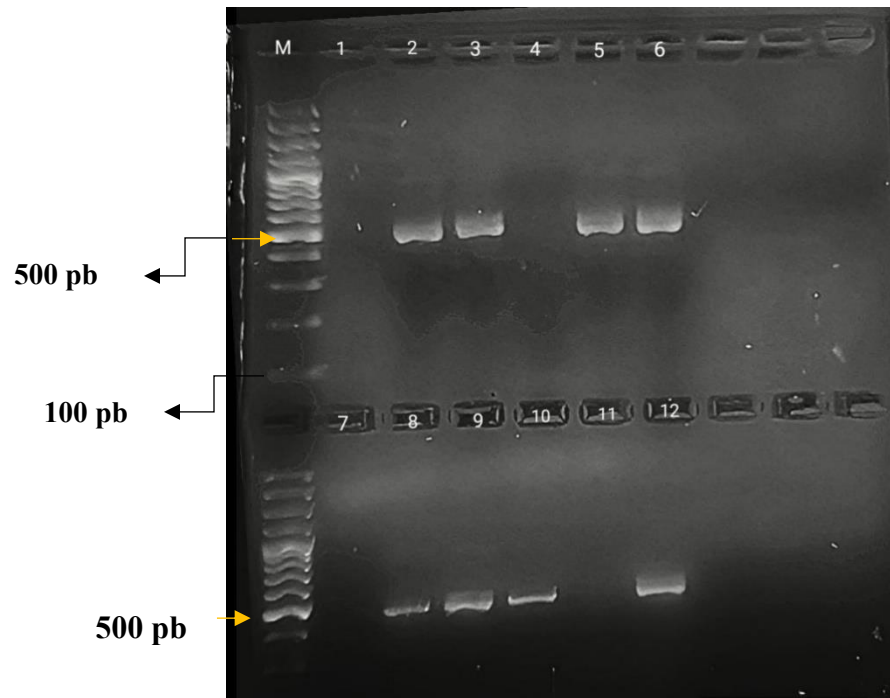
Resultados de la electroforesis para las muestras de ADN E02, E05, E06, E07, E10, E11, E12 y E13.



Nota. (M) Marcador de peso molecular. E05(2), E06(3), E07(4) muestras positivas. E02(1), E10(5), E11(6), E12(7) y E13(8), muestras negativas. Control positivo (9). Control negativo (10)

Figura 10

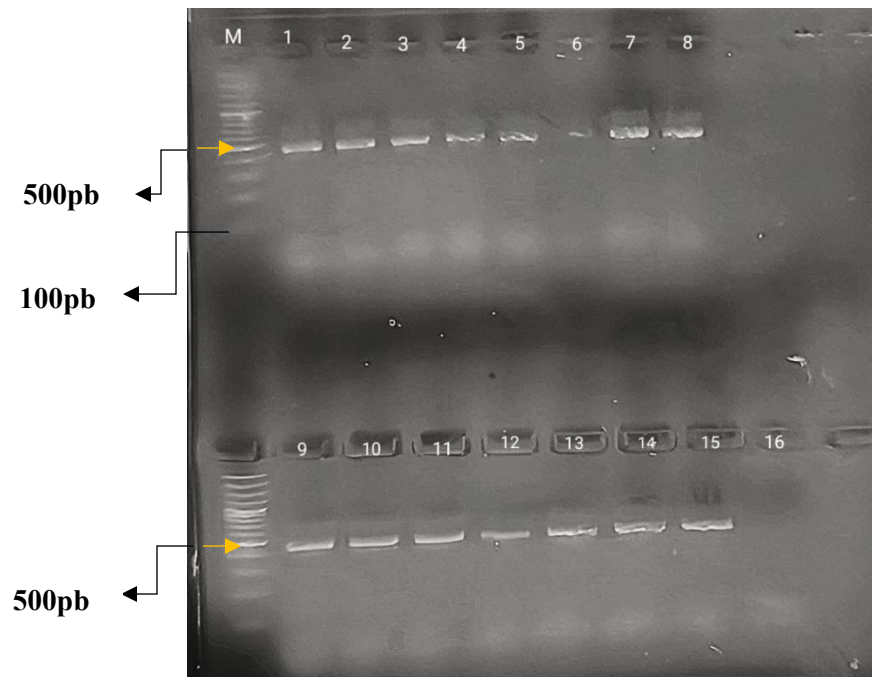
Resultados de la electroforesis para las muestras de ADN E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E20.



Nota. (M) Marcador de peso molecular. E11(2), E12(3), E14(5), E15(6), E17(8), E18(9) Y E20(10), muestras positivas. E10(1), E13(4), E16(7), muestras negativas. Control positivo (12). Control negativo (11)

Figura 11

Resultados de la electroforesis para las muestras de ADN E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31, E32, E33, E34



Nota. (M) Marcador de peso molecular. E21(1), E22(2), E23(3), E24(4), E25(5), E26(6) E27(7), E28(8), E29(9), E30(10), E31(11), E32(12) E33(13), E34(14) muestras positivas. No se observan muestras negativas. Control positivo (15). Control negativo (16)

Figura 12

Porcentajes de animales positivos y negativos a la PCR para detectar Ehrlichia canis



De los 33 pacientes muestreados, 18 de ellos contaban con test de inmunocromatografía, de los cuales 17 fueron positivos al test y 1 negativo. Sin embargo, a la PCR de los 18 pacientes que presentaban test 15 fueron positivos y 3 fueron negativos.

Los pacientes que estuvieron en contacto con el vector fueron en total 7, los cuales en su totalidad fueron positivos a *E. canis* por PCR.

Aquellos pacientes que eran sospechosos porque presentaban sintomatología compatible con EMC, fueron en total 7, de los cuales 6 de ellos resultaron ser positivos por PCR a *E. canis*.

El paciente sospechoso por contacto con un animal infectado que compartía el mismo entorno, resultó ser negativo a la PCR. En la Tabla 6 se observa un resumen de la correlación de la edad y clínica de los pacientes con los resultados de los diferentes métodos diagnósticos

Tabla 6*Relación de los diferentes métodos diagnósticos*

Código paciente	Edad	Inmunocromatografía	Síntomas	Garrapatas	Resultado PCR
E01	2 años	Positivo	Fiebre, depresión	N/A	Positivo
E02	2 años	N/A	Trombocitopenia	N/A	Negativo
E03	7 años	N/A	Depresión	N/A	Negativo
E04	9 años	Positivo	Anorexia, depresión, fiebre	N/A	Positivo
E05	1 mes	N/A	Vómito, pérdida de peso, anorexia	Sí	Positivo
E06	4 años	Positivo	Anorexia, pérdida de peso	N/A	Positivo
E07	5 meses	Positivo	Pérdida de peso	N/A	Positivo
E08	5 años	Positivo	N/A	N/A	Positivo
E09	4 años	Positivo	N/A	N/A	Positivo
E10	1 año	Positivo	Fiebre, pérdida de peso	N/A	Negativo
E11	3 meses	Positivo	N/A	N/A	Positivo
E12	10 años	N/A	Pérdida de peso	N/A	Positivo
E13	7 años	Positivo	Anorexia, fiebre, vómito y diarrea	N/A	Negativo
E14	2 años	N/A	Fiebre, linfadenitis	N/A	Positivo
E15	1 año	Positivo	N/A	N/A	Positivo
E16	5 años	Negativo	Fiebre, pérdida de peso, petequias	N/A	Negativo
E17	10 meses	Positivo	Pérdida de peso, anorexia	N/A	Positivo
E18	18 meses	Positivo	Anorexia, pérdida de peso, fiebre	N/A	Positivo
E20	4 años	Positivo	N/A	N/A	Positivo
E21	5 años	N/A	Fiebre, depresión	N/A	Positivo
E22	1 año	Positivo	Pérdida de peso	N/A	Positivo
E23	7 años	Positivo	Fiebre, anorexia, vómito	N/A	Positivo
E24	10 años	N/A	N/A	Sí	Positivo
E25	3 años	Positivo	Diarrea, vómito, pérdida de peso, trombocitopenia	N/A	Positivo
E26	5 años	N/A	N/A	Sí	Positivo
E27	3 meses	Positivo	Pérdida de peso, fiebre	N/A	Positivo
E28	7 años	N/A	N/A	Sí	Positivo
E29	2 años	N/A	N/A	Sí	Positivo
E30	4 años	N/A	N/A	Sí	Positivo
E31	1 año	N/A	Pérdida de peso	Sí	Positivo
E32	3 años	N/A	N/A	Sí	Positivo
E33	10 años	N/A	Fiebre, petequias, trombocitopenia	Sí	Positivo
E34	5 años	N/A	Fiebre, depresión, anorexia	Sí	Positivo

Fuente. *Elaboración propia*

4.2 Discusión

En el presente trabajo se logró estandarizar la técnica de PCR de punto final para el diagnóstico de *Ehrlichia canis* en el laboratorio de Ciencias Biomédicas del centro CEDIMOL, utilizando los primers o cebadores específicos ECC y ECB sugeridos por Dawson et al 1994, gracias a esta especificidad, se logró obtener resultados satisfactorios que permitieron el diagnóstico molecular en el 84,8% de los pacientes estudiados, incluso en aquellos que presentaban coinfección con otros hemoparásitos e infecciones crónicas o infecciones persistentes. Según Carrillo et al 2012, la PCR al tener una alta sensibilidad y especificidad se convierte en una prueba confirmatoria para el diagnóstico de EMC.

El método de extracción de ADN por fenol cloroformo, es rápido y barato, lo que le confiere una gran ventaja sobre los kits comerciales de extracción basados en los sistemas de columnas, sin embargo una de las limitantes puede ser los restos de fenol o proteínas que pueden quedar en la muestra, Guzmán et al 2018, sugiere que la pureza de las muestras (relación 260/280) idealmente debe encontrarse entre 1,6 y 2,0 ng/ul, a pesar de la evidencia de contaminación en algunas de nuestras muestras, no se observó una inhibición de la PCR, ya que como lo sugiere Luebbehusen (2010), estos valores resultan mucho más variables y dependen en gran medida de factores como la concentración del ADN. Esto puede estar relacionado a que, en contraste a la contaminación inherente encontrada, el MFC arrojó unas altas concentraciones de ADN lo que permitió unos resultados satisfactorios al momento de desarrollar la PCR.

Alejos, Aragón y Cornejo, (2014) mencionan que las concentraciones mínimas de ADN deben ser mayores a 5ng/ul para la obtención de datos satisfactorios en la PCR. En nuestro caso

obtuvimos concentraciones de hasta 200 ng/ul y un promedio de 20 ng/ul, muy por encima de lo indicado como ideal.

La alta concentración de ADN también puede estar relacionada con la utilización completa de la muestra, a diferencia de utilizar solo el “*buffy coat*” obtenido en la interfase entre los glóbulos rojos y el plasma obtenido por centrifugación. Inicialmente durante la extracción se tuvo problemas con la obtención de la fase acuosa, en la cual se concentra el ADN, problema que fue resuelto con la utilización de PBS para diluir el gran pellet de blancos obtenido.

Cabe resaltar que la sensibilidad de la prueba no pudo ser determinada al no tener acceso a un cultivo puro de *E. canis* por lo que se sugiere se realice en estudios posteriores.

Para la realización de la PCR se decidió utilizar los primers sugeridos por Dawson et al 1994 y los cuales han sido previamente usados en distintos estudios (Rodríguez et al 2020; Martínez et al 2015; Aragón et al 2021), estos corresponden a una región sobre el gen ribosomal 16S la cual ha sido ampliamente usada para las determinaciones taxonómicas en diferentes microorganismos debido a ser regiones conservadas (Weinroth et al, 2022; Kim et al, 2022). En nuestro estudio, otros primers diseñados sobre la misma región no tuvieron éxito (datos no mostrados) esto puede estar asociado a factores técnicos, aunque no se descarta que pueda estar relacionado con la existencia de diferentes variantes de *E. canis*, ya que hasta el momento se han determinado 5 genotipos cuyas diferencias están basadas en el gen que codifica para la proteína TRP 36. (Arroyave et al, 2020)

Al existir diversos métodos de diagnóstico rápidos y económicos, la EMC se ha convertido en una enfermedad que se diagnostica fácilmente en clínicas veterinarias. Dentro de estos métodos diagnósticos una de las más comunes es la presencia de sintomatología asociada a

la enfermedad. En nuestro caso 7 pacientes fueron sospechosos a EMC, de los cuales 6 fueron positivos a la PCR. Los principales motivos de consulta de los animales muestreados fueron anorexia, presencia de garrapatas, depresión, fiebre, pérdida de peso. En relación a la presencia de PCR positiva a *Ehrlichia canis* en nuestros pacientes, se pudo observar que los síntomas permiten sospechar de la presencia de la enfermedad, pero no es un parámetro determinante. Estos resultados según Carrión (2017) y Guerrero (2016), si bien no constituyen un método diagnóstico específico, dependen mucho de la información brindada por el propietario acerca de la exposición al vector y las condiciones del entorno, para encaminarse hacia el diagnóstico de la enfermedad.

Las pruebas serológicas como ELISA, IFI o Inmunocromatografía basadas en la detección de anticuerpos, son los métodos más utilizados por su practicidad y rapidez en los resultados. Zweygarth et al, 2014 sugiere que en el caso de ELISA presenta una sensibilidad del 98.8% y una especificidad del 100% y 67% -71% respectivamente en el caso de IFI convirtiéndolas así en pruebas confiables y rápidas en el diagnóstico de EMC, pero no descartando la posibilidad de numerosos falsos negativos o falsos positivos. Esto concuerda con los datos obtenidos de los pacientes muestreados y con los resultados obtenidos de la PCR donde de los 18 pacientes positivos por test, solo 3 resultaron negativos en la PCR, posiblemente debido a que estos pacientes presentaban coinfección con otros hemoparásitos pudiendo ocasionar una reacción cruzada, o como lo sugiere Carrillo et al 2012, estos pacientes pueden estar cursando un tratamiento antibiótico disminuyendo así la fase aguda de la enfermedad.

Harrus et al 2004 indican que los tratamientos apropiados con doxiciclina resultan en una recuperación clínica y hematológica a partir de los estados agudos y la eliminación del DNA de

Ehrlichia canis medido por PCR. En contraste otros reportes sugieren que los perros pueden permanecer persistentemente infectados por largos periodos de tiempo y posiblemente por toda la vida a pesar de los tratamientos antibióticos. (Bartsch & Greene, 1996; Skotarczak, 2003) pero demostrando que, estos test comerciales usados habitualmente en el ámbito clínico son muy fiables, sin embargo, se sugiere por su alta especificidad la PCR como método de diagnóstico confirmatorio.

Mediante el uso de la PCR como técnica de diagnóstico molecular para *Ehrlichia canis*, desarrollada en el presente trabajo, se obtuvo que de los 33 pacientes muestreados 28 resultaron positivos a EMC. Teniendo en cuenta que fueron pacientes que se encontraban en distintas fases de la enfermedad, con este estudio se pudo comprobar que el diagnóstico de EMC mediante PCR puede obtenerse en cualquier fase de la enfermedad permitiendo el diagnóstico oportuno incluso en 2 pacientes que fueron diagnosticados de cachorros y que actualmente con 4 y 5 años de edad aun eran positivos a la PCR, igualmente la técnica permite detectar el parásito antes de desarrollar anticuerpos, a diferencia de las pruebas serológicas que llega a ser más específicas en fase aguda o generar reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos contra otros microorganismos. Así mismo, se pudo observar que la presencia de EMC no se encontró relacionada a factores como sexo, edad o raza.

La presencia de garrapatas fue otro factor importante para sospechar de la infección. En nuestro estudio 7 pacientes muestreados presentaban garrapatas y todos resultaron positivos a la PCR, lo que indica la estrecha relación entre la presencia del vector y la endemicidad de la enfermedad.

La EMC en nuestro medio es una enfermedad endémica debido a las condiciones tropicales y al cambio climático lo cual ha llevado a la presentación de casos en Pamplona, una ciudad que presenta una altitud de 2200 msnm. Esto concuerda con lo reportado por Guerrero (2016), en un estudio llevado a cabo en la ciudad de Bogotá donde se encontró la presencia de garrapatas (*R. sanguineus*) en caninos residentes en la ciudad. La presencia del vector en zonas frías como Pamplona puede deberse al aumento gradual de la temperatura en el planeta, a una mejor adaptación del mismo a dicho entorno y a la movilización de los animales entre diferentes pisos térmicos, así como al aumento de la población canina en los últimos años

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con Franco, Adame & Dzul (2019), quienes sugieren que la PCR tiene una mayor sensibilidad y especificidad debido a la capacidad de diseñar cebadores dirigidos a un género o especie en particular, haciéndola una prueba de elección a la hora del diagnóstico de enfermedades infecciosas como la EMC.

La PCR como prueba de diagnóstico molecular para enfermedades infecciosas como la EMC, se vuelve un gran aliado a la hora de emitir diagnósticos definitivos en la práctica clínica. Si bien puede considerarse una prueba de elección, se debe tener en cuenta los demás factores como lo son la anamnesis, sintomatología, hemograma y la aplicación de pruebas serológicas, que permitan sospechar de la presentación de la enfermedad.

En el presente trabajo se logró la estandarización de la PCR para el diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis*, siendo el primer acercamiento en CEDIMOL al diagnóstico molecular de EMC. Sin embargo, las limitantes como el tiempo del estudio no permitieron el estudio más a fondo de la epidemiología de la enfermedad en nuestro medio, sentando así la base para estudios posteriores sobre los genotipos que se encuentran circulando y que diferencias existen a nivel

clínico entre ellos, con el fin de aportar información más precisa a la hora de emitir diagnósticos clínicos y tratamientos adecuados.

Capítulo V

5.1. Conclusiones

Se determinó la presencia de *E. canis* en muestras de sangre de animales sospechosos y/o diagnosticados con EMC mediante la técnica de PCR utilizando cebadores previamente descritos.

El método de extracción fenol- cloroformo- alcohol isoamílico, utilizado en este estudio resultó ser un método efectivo, obteniéndose altas concentraciones de ADN a partir de las muestras de sangre.

Las concentraciones y la calidad del ADN extraído mediante el método Fenol- cloroformo a pesar de ser muy variables entre muestras y presentar contaminación, no fue una limitante a la hora de obtener la amplificación del ADN.

La PCR estandarizada en el presente trabajo resultó ser una prueba confiable para la detección de EMC especialmente en animales sospechosos que no contaban con un diagnóstico previo.

5.2. Recomendaciones

Realizar una curva de sensibilidad utilizando DNA extraído a partir de un cultivo de *Ehrlichia canis* con el fin de determinar la mínima cantidad de microorganismo que puede ser detectada en la prueba.

Se recomienda comparar el método fenol cloroformo con otros métodos comerciales de extracción de ADN con el fin de mejorar la calidad y concentraciones obtenidas.

Determinar los genotipos de *Ehrlichia canis* presentes en la región con el fin de realizar un análisis más a fondo de las diferencias clínicas que puedan encontrarse.

5.3. Referencias

- Aguirre E., Sainz A., Dunner S., Amusatogui I. & López L (2004). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet Parasitol*; 125(3-4), pp.365-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.007>
- Alejos, L., Aragón, M. y Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En Cornejo, A., Serrato, A., Rendon, B. & Rocha, M., *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. pp 1- 17. México.
- Allison R. & Little S. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 42(2), pp.127-144, DOI:10.1111/vcp.12040.
- Aragón, C., Luna, P., Ortiz, V., Leyva, J., Cantú, E. & Reyna, J. (2021). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Rickettsia rickettsii* in domestic canines from the municipality of Cajeme, Sonora, Mexico. *Abanico vet* 11(129), pp. 1- 15. DOI: <https://doi.org/10.21929/abavet2021.45>
- Arroyave, E., Rodas, J., Zhang, X., Labruna, M., Gonzales, M., Fernandez, J. & McBride, J. (2020). *Ehrlichia canis* TRP36 diversity in naturally infected-dogs from an urban area of Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 11(3), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101367>

- Bartsch, R. & Greene, R. (1996). Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and or doxycycline. *J. Vet. Int. Med.* 10(4) pp. 271–274. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02061.x>
- Birchard S. & Sherding R. (1994). Enfermedades por Rickettsias. En: Manual clínico de Pequeñas especies. Recuperado de <https://bibliotecamvz.forumotion.com/t835-manual-clinico-de-pequenas-especies-de-birchard#1585>
- Cadavid, V., Franco, Y. y Morales, L. (2012). Frecuencia de presentación de Ehrlichiosis canina en la clínica de pequeñas especies en la Universidad de Antioquia, en el periodo comprendido entre enero a junio de 2011. Recuperado de <https://marthanellymesag.weebly.com/uploads/6/5/6/5/6565796/ehrlichiosis.pdf>
- Cartagena, L. (2015). Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Rev. Med. Vet.* 1(29), pp. 51-62, DOI: <https://doi.org/10.19052/mv.3446>
- Carrillo, L., Betancur, S., Roldán, D., Pérez, J., Galeano, D., Loaiza, E. y Giraldo, C. (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), pp. 38-46. Recuperado de <https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2714>
- Carrión, F. (2017). Cambios hematológicos en caninos positivos a *Ehrlichia canis* tratados con Dipropionato de Imidocarb. (Trabajo de grado). Recuperado de <http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/UNHEVAL/3413>

- Castro, L., González, J & Rincon, J. (2016). Revisión: Situación actual de la ehrlichiosis en perros y zorros de América. Trabajo de grado. Recuperado de <https://repositorio.utp.edu.co/items/66cc7e93-4dec-4ebb-8749-2c1e012619a1>
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(5), pp. 299-305. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X0473092X>
- Dawson, J., Stallknecht, D., Howerth, E., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W., Lockhart, J., Nettles, V., Olson, J. & Childs, J. (1994). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 32(11), pp. 2725–2728, DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994>
- Domínguez, G. (2011). *Prevalencia E Identificación De Hemoparásitos (Ehrlichia Canis, Babesia Canis Y Anaplasma Phagocytophilum) En Perros De La Ciudad De Cuenca*. (Trabajo de grado). Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3024>
- Dumler, J., Barbet, A., Dasch, G., Palmer, G., Ray, S., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F. (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), pp. 2145-2165, DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

- Franco, M., Adame, J. & Dzul, K. (2019). Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Revista chilena de 62rgano62logía : 62rgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 36(5), pp. 650–655. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>
- Gaitán, J. (2021). Actualización de métodos diagnósticos y tratamiento en Ehrlichia Canis. (Trabajo de grado). Recuperado de <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/35001>
- Gómez, J., Gonzales, J. y Parra, D. (2021). Revisión sistemática: Diagnóstico y tratamiento para ehrlichiosis en caninos. (Trabajo de grado). Recuperado de <https://repositorio.utp.edu.co/items/e56df9ed-d0e1-4e9f-92e3-ee1e49bda856>
- Gonzalez, M., Hodžić, A., Corona, B., Cordeiro, M., da Silva, C., Báez, L., Obregón, D., de Aguiar, D., da Silva, A., Taques, Í., Wu-Chuang, A., López, E., Piloto, E., Abuin-Denis, L., da Fonseca, A. & Cabezas, A. (2022). Novel Ehrlichia canis genogroup in dogs with canine ehrlichiosis in Cuba. *Parasites & vectors*, 15(1), pp. 295, DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05426-0>
- Guerrero, C. (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). (trabajo de grado). Recuperado de <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/632>
- Gutiérrez, C., Pérez, L. & Agrela, I. (2016). EHRLICHIOSIS CANINA. SABER. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28 (4), pp. 641-665. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427751143001>

- Guzmán, L., Cortés, M., Pichardo, J., & Arteaga, R. (2018). Comparación de protocolos de aislamiento de DNA a partir de semilla de soya. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(8), DOI: doi.org/10.29312/remexca.v9i8.872
- Hajdušek, O., Síma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., & Kopáček, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(26). DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026>
- Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T. & Shaw, S. (2004). Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(11), pp. 4488–4490. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4488-4490.2004>
- Irwin .& Beadle, J. (2022). The ‘other’ epidemic: canine ehrlichiosis in Australia. *Microbiology Australia* 43(4), pp.156–159, DOI:10.1071/MA22053
- Jenkins, S., Ketzis, J. K., Dundas, J., & Scorpio, D. Efficacy of minocycline in naturally occurring nonacute ehrlichia canis infection in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1), pp. 217- 221. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29197122/>
- Kim, Y., Seo, J., Kim, S.& Lee, H. (2022). Molecular detection of Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia species in ticks removed from humans in the republic of Korea. *Microorganisms* 10(1224), pp. 1- 11. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061224>

Liu, Y., Zhang, Z., Jiang, Y., Zhang, L., Popov, V., Zhang, J., Walker, D. & Yu, X. (2011).

Obligate intracellular bacterium *Ehrlichia* inhibiting mitochondrial activity. *Microbes and infection*, 13(3), pp. 232–238, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.10.021>

López, A y Soler, D. (2020). Ehrlichiosis canina y su contextualización en Colombia. En Posada, S.; Cabrera, A y Monsalve, S. Enfermedades rickettsiales en Latinoamérica. (pp. 63 -76). Medellín: Artes y letras

López, M. (2021). Métodos diagnósticos clínicos para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* en pequeños animales: Revisión sistemática de literatura. (Trabajo de grado). Recuperado de https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/3344/1/Metodos_diagnosticos_clinicos_detectar_presencia_Ehrlichia_canis_pequenos_animales_Revision_sistematica_literatura..pdf

Luebbehusen, H. (2010) The Significance of the 260/230 Ratio in Determining Nucleic Acid Purity. Recuperado de: <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100>

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. DOI: <https://doi.org/10.55460/1VBK-JXC7>

Martinez, M., Arraga, C., Triana, F., Ruiz, J. y Gutierrez, N. (2015). Estudio serológico y molecular de *Ehrlichia canis* en perros de una comunidad del estado Aragua, Venezuela. *Rev Inv Vet Perú* 26(4), pp. 648- 656. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11220>

- Márquez, F., Hidalgo, A., Contreras, F., Rodríguez, J. y Muniain, M. (2005). Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23 (2), pp. 94-102.
Recuperado de <https://medes.com/publication/16250>.
- Pérez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical sings in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, pp. 110- 117. DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>
- Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). (2008). Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP. Recuperado de genomica.uaslp.mx
- Ramkant, Kumar, R., Verma, HC & Diwakar, RP. (2020). Canine ehrlichiosis: A review. *Journal of entomology and Zoology studies*. 8(2), pp. 1849 – 1852. DOI: 10.13140/RG.2.2.27635.68649
- Rikihisa Y. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol*. 8(5), pp. 328-339. DOI: doi:10.1038/nrmicro2318.
- Rodriguez, C., Beristain, D., Olivares, A., Quesada A., Pérez, F., Alvarez, J., Tapia, J., Lira, J., Rivera, R., Cera, O., Ibancovich, J., Soon, L., Adame, J.& Figueroa, J. (2020). Demonstrating the presence of *Ehrlichia canis* DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. *Parasites vectors*, 13(518) pp. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04363-0>

Rodríguez, I. y Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 2(3), pp. 323- 335. Recuperado de

https://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf

Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S. & Solano, L. (2015).

Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe.

Parasites & Vectors, 8(1), 75. DOI:10.1186/s13071-015-0649-0

Sandoval, A., Martinez, A. y Lopez, D. (2013). Extracción de ácidos nucleicos. En *Biología*

molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Salazar Montes A, &

Sandoval Rodríguez A, & Armendáriz Borunda J(Eds.), *Biología molecular*.

Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw Hill.

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=10274365>

8

Sandoval A., Floresvillar, J. y Meza, A (2013). Reacción en cadena de la polimerasa. Salazar

Montes A, Sandoval Rodríguez A, & Armendáriz Borunda J(Eds.), *Biología molecular*.

Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw Hill.

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=10274399>

9

Silva, R. (2008). Reporte de presentación de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de caninos

en la ciudad de Cali, Colombia. *vet.zootec*, 2 (1), pp.27-31, Recuperado de

<https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/5743>

Skotarczak B. (2003). Canine ehrlichiosis. *Annals of agricultural and environmental medicine:*

AAEM, 10(2), 137–141. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14677903/>

- Tamí, I & Tamí, I M. (2004). Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*, 16(5), pp. 345- 349. Recuperado de <https://scielosp.org/article/rpsp/2004.v16n5/345-349/es/>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velazquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimeras (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2 (2)p. 70-78. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/rid>.
- Tang, Y., Sefers, S., Li, H., Kohn, D. & Procop, G. (2005). Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of clinical microbiology*, 43(9), pp 4830–4833. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4830-4833.2005>
- Tizard, I. (1996). Veterinary immunology. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/785697/Plaza_5592_Tema_9_Sub._1_Immunologia_veterinaria.pdf
- Trapp, S. M., Dagnone, A. S., Vidotto, O., Freire, R. L., Amude, A. M., & de Moraes, H. S. (2006). Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary parasitology*, 140(3-4), pp. 223–230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.030>
- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L., 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. *Vet parasitol*, 186(3-4), pp. 254–260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>

- Vieira, R., Biondo, A., Guimarães, A., Dos Santos, A., Dos Santos, R., Dutra, L., Diniz, P., de Moraes, H., Messick, J., Labruna, M. & Vidotto, O. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 20(1), pp 1–12, DOI: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100002>
- Waner T., Strenger C. & Keysary A. (2002). Comparison of a Clinic-Based ELISA Test Kit with the Immunofluorescence Test for the Assay of *Ehrlichia canis* Antibodies in Dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(3), pp. 240–244. DOI: [doi:10.1177/104063870001200307](https://doi.org/10.1177/104063870001200307)
- Weinroth, M., Belk, A., Dean, C., Noyes, N., Dittoe, D., Rothrock, M., Ricke, S., Myer, P., Henniger, M., Ramirez, G., Oakley, B.; Summers, K., Miles, A., Ault- Seay, T., Yu, Z., Metcalf, J. & Wells, J. (2022). Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *Journal of Animal Science*, 100(2), pp. 1- 18. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/skab346>
- Wu, T., & Huang, H. (2009). Prevalence and Risk Factors of Canine Ticks and Tick-Borne Diseases in Taipei, Taiwan. *JVCS*, 2(3), pp 75-78. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/228719621_Prevalence_and_Risk_Factors_of_Canine_Ticks_and_Tick-Borne_Diseases_in_Taipei_Taiwan
- Zweygarth E., Cabezas A., Josemans A., Oosthuizen M., Matjila P., Lis K. & Passos L. (2014). In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), pp 423–431, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.011>

Anexos

Anexo A Pacientes participantes en el estudio, tipo de diagnóstico en clínica veterinaria, coinfección y resultado de la PCR.

Código	Paciente	Edad	Lugar	Tipo de diagnóstico	Otros hemoparásitos	Resultado PCR
E01	Luna	2 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	test rápido positivo a Ehrlichia	Hepatozoon	Positivo
E02	Kyra	2 años	Clínica Veterinaria El rebaño- Cúcuta	Trombocitopenia.	No	Negativo
E03	Aysha	7 años	Cúcuta	Sospecha por contacto con animal infectado	No	Negativo
E04	Niña	9 meses	Cúcuta	test rápido positivo a Ehrlichia	No	Positivo
E05	Luna	1 mes	Clínica Veterinaria VETMEDICAL-Pamplona	cuadro hemático, sintomatología, presencia de garrapatas	No	Positivo
E06	Nerón	4 años	Clínica Veterinaria VETMEDICAL-Pamplona	test rápido positivo a Ehrlichia	No	Positivo
E07	Sky	5 meses	Clínica Veterinaria VETMEDICAL-Pamplona	test rápido positivo a Ehrlichia	No	Positivo
E08	Rupert	5 años	Clínica Veterinaria VETMEDICAL-Pamplona	test rápido positivo a Ehrlichia cuando era cachorro	No	Positivo
E09	Maximiliano	4 años	Clínica Veterinaria VETMEDICAL-Pamplona	test rápido positivo a Ehrlichia cuando era cachorro	Anaplasma	Positivo
E10	Meavy	1 año	Clínica Veterinaria	test rápido positivo a Ehrlichia	Anaplasma	Negativo

			VETMEDICAL- Pamplona			
E11	Alana	3 meses	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	test rápido positivo a hemoparásitos	no	positivo
E12	Mona	10 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta		No	Positivo
E13	Tommy	7 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	PCR positiva a E. canis, junto con prueba rápida de hemoparásitos	Anaplasma	Negativo
E14	Kaina	2 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	no presenta test, se sospecha por sintomatología	No	Positivo
E15	Scott	1 año	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	test rápido positivo a hemoparásitos	Anaplasma	Positivo
E16	Panda	5 años	Clínica Veterinaria Perros y Gatos - Cúcuta	test de hemoparásitos negativo a Ehrlichia y Anaplasma	No	Negativo
E17	Max	10 meses	Hospital Veterinario- Cúcuta	test rápido positivo a Anaplasma, se sospecha de Ehrlichia	Anaplasma	Positivo
E18	Tilín	18 meses	Hospital Veterinario- Cúcuta	test rápido positivo a hemoparásitos	Anaplasma	Positivo
E20	Chaz	4 años	Hospital Veterinario San Rafael- Cúcuta	test rápido positivo	No	Positivo
E21	Dogui	5 años	Mis Peluditos- Cúcuta	no presenta test, se sospecha por sintomatología		Positivo

E22	Kyra	1 año	Hospital Veterinario- Cúcuta	test rápido positivo a <i>Ehrlichia</i> , sintomatología	No	Positivo
E23	Zoe	7 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	Presenta test positivo, sintomatología	No	Positivo
E24	Candy	10 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	se sospecha por contacto con el vector		Positivo
E25	Estrella	3 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	test positivo a <i>Ehrlichia</i>	No	Positivo
E26	Prince	5 años	Hospital Veterinario- Cúcuta	se sospecha por contacto con el vector		Positivo
E27	Lola	3 meses	Clínica Veterinaria VETMEDICAL- Pamplona	Presenta test positivo a <i>Ehrlichia</i>	No	Positivo
E28	Canela	7 años	Mis Peluditos- Cúcuta	presencia de garrapatas		Positivo
E29	n.n	2 años	Mis Peluditos- Cúcuta	presencia de garrapatas		Positivo
E30	Ringo	4 años	Mis Peluditos- Cúcuta	presencia de garrapatas		Positivo
E31	Tobby	1 año	Mis Peluditos- Cúcuta	presencia de garrapatas, sintomatología		Positivo
E32	Ringo	3 años	Mis Peluditos- Cúcuta	presencia de garrapatas		Positivo
E33	Laika	10 años	Mis Peluditos- Cúcuta	sospecha por sintomatología		Positivo
E34	Negrita	5 años	Mis Peluditos- Cúcuta	sospecha por sintomatología		Positivo

Anexo B. Resultados de la espectrofotometría de luz UV, para las muestras de ADN extraídas.

Muestra	Concentración	A260	260/280	260/230
E01	8,7 ng/ul	0,173	1,15	0,39
E02	18,4 ng/ul	0,368	1,65	1,2
E03	11,2 ng/ul	0,224	1,41	0,73
E04	3,5 ng/ul	0,071	1,27	0,7
E05	14,5 ng/ul	0,289	1,3	0,98
E06	3,6 ng/ul	0,073	2,19	0,33
E07	1,4 ng/ul	0,029	1,43	0,81
E08	2,4 ng/ul	0,049	2,2	0,75
E09	4,9 ng/ul	0,099	1,7	1,4
E10	3,0 ng/ul	0,059	3,89	0,94
E11	2,6 ng/ul	0,051	2,26	1,82
E12	5,7 ng/ul	0,111	1,08	0,34
E13	13,2 ng/ul	0,264	1,08	1,16
E14	2,9 ng/ul	0,058	0,94	0,99
E15	8,5 ng/ul	0,17	1,1	1,22
E16	4,0 ng/ul	0,08	0,85	0,71
E17	17,8 ng/ul	0,357	1,28	1,06
E18	16,6 ng/ul	0,332	1,59	1,47
E20	13,3 ng/ul	0,266	1,16	1,18
E21	45,5 ng/ul	0,91	1,64	1,71
E22	10,8 ng/ul	0,216	1,5	1,73
E23	10,8 ng/ul	0,21	1,56	1,51
E24	28,8 ng/ul	0,576	1,6	1,31
E25	6,1 ng/ul	0,122	1,03	1,29
E26	35 ng/ul	0,70	1,73	1,76
E27	15 ng/ul	0,118	1,18	1,08
E28	16,5 ng/ul	0,329	1,12	1,04
E29	11,6 ng/ul	0,232	1,28	1,03
E30	52 ng/ul	1,041	0,60	0,57
E31	205,9 ng/ul	4,113	0,85	0,84
E32	16,8 ng/ul	0,336	0,81	0,74
E33	24,5 ng/ul	0,490	1,11	1,17
E34	17,9 ng/ul	0,359	0,48	0,47