



Ciencia Latina
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), marzo-abril 2024,
Volumen 8, Número 2.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i2

**DETECCIÓN MOLECULAR CON LA TÉCNICA
DE PCR EN UN SOLO PASO PARA EHRlichia CANIS EN
PERROS DEL CANTÓN PONCE ENRÍQUEZ, ECUADOR**

MOLECULAR DETECTION OF EHRlichia CANIS USING
ONE-STEP PCR TECHNIQUE IN DOGS FROM PONCE
ENRÍQUEZ CANTON, ECUADOR

Mvz. Silvia Vásquez Borja

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Mvz. Fernando L. Aguilar Gálvez

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Mvz. Ana E. Guerrero López

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Ing, Agr. Brian Juvenal Mocha Cuenca

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Mvz. Miluska Vanessa Baylòn Cuba

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Mvz. Robert G. Sánchez Prado

Universidad Técnica de Machala, Ecuador

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i2.11234

Detección Molecular con la Técnica de PCR en un solo Paso para *Ehrlichia Canis* en Perros del Cantón Ponce Enríquez, Ecuador

Mvz. Silvia Vásquez Borja¹

scvasquezb_est@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0008-9233-6834>

Universidad Técnica de Machala
Ecuador

Mvz. Fernando L. Aguilar Gálvez

flaguilar@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0009-080048004>

Universidad Técnica de Machala
Ecuador

Mvz. Ana E. Guerrero López

anitaguerrero19@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-6081-9163>

Docente Universidad Técnica de Machala
Ecuador

Ing, Agr. Brian Juvenal Mocha Cuenca

bmocha@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-5989-7516>

Universidad Técnica de Machala
Ecuador

Mvz. Miluska Vanessa Baylón Cuba

mbaylonc@iest24dejuliodezarumilla.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0003-1103-345X>

Instituto de Educación Superior Tecnológico
24 de Julio de Zarumilla
Perú

Mvz. Robert G. Sánchez Prado

rgsanchez@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-1611-8201>

Universidad Técnica de Machala
Ecuador

RESUMEN

La Ehrlichiosis es una enfermedad infecciosa transmitida por garrapatas en perros y otros cánidos, es causada por *Ehrlichia canis* (*E. canis*) y su diagnóstico es fundamental para su manejo clínico y control de la patología. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser una herramienta eficaz para la detección molecular de *E. canis*, permitiendo una identificación específica y sensible de la bacteria en perros infectados. Este estudio fue diseñado para detectar la presencia de *E. canis* utilizando el método de diagnóstico molecular por PCR en un solo paso, considerando las posibles variantes moleculares que pueden surgir. El resultado evidenció que de 120 pacientes caninos sintomáticamente compatibles con *E. canis*, 45 resultaron positivos al kit de Inmuno cromatografía (45/145), dando una prevalencia de 37,5% de positividad a la presencia de anticuerpos a *E. canis*. Y la amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para *E. canis* se dio en 14 animales del total de 45 positivos a IC, con tasa de infección del 31,11%, con un amplicón de 409 pb como producto final. Los valores encontrados en la tasa de infección de *E. canis* con relación a la edad, sexo y raza no fueron significativos (p -valor >0.005), al no encontrar diferencias podemos indicar que estas condiciones no afectan de ninguna forma la incidencia de la enfermedad y su positividad. Este estudio logró confirmar la presencia de la bacteria en los animales muestreados por medio de PCR en un solo paso y propone la implementación de esta técnica como herramienta diagnóstica en la ciudad.

Palabras claves: PCR, caninos, *Ehrlichia canis*, molecular

¹ Autor principal

Correspondencia: scvasquezb_est@utmachala.edu.ec

Molecular Detection of Ehrlichia Canis Using One-Step PCR Technique in Dogs from Ponce Enríquez Canton, Ecuador

ABSTRACT

Ehrlichiosis is a tick-borne infectious disease in dogs and other canids, caused by Ehrlichia canis (E. canis), and its diagnosis is crucial for clinical management and disease control. Polymerase Chain Reaction (PCR) has proven to be an effective tool for the molecular detection of E. canis, allowing specific and sensitive identification of the bacteria in infected dogs. This study was designed to detect the presence of E. canis using the one-step PCR molecular diagnostic method, considering possible molecular variants that may arise. The results showed that out of 120 symptomatic canine patients compatible with E. canis, 45 tested positive for the Immunochromatographic (IC) kit (45/145), yielding a prevalence of 37.5% positivity for E. canis antibodies. PCR amplification using specific primers for E. canis was observed in 14 animals out of the total 45 positive for IC, with an infection rate of 31.11%, yielding a 409 bp amplicon as the final product. The values found in the E. canis infection rate concerning age, sex, and breed were not significant (p -value >0.005). As no differences were found, we can indicate that these conditions do not affect the incidence of the disease and its positivity. This study confirmed the presence of the bacteria in the sampled animals using one-step PCR and proposes the implementation of this technique as a diagnostic tool in the city.

Keywords: PCR, canines, Ehrlichia canis, molecular

Artículo recibido 28 marzo 2024

Aceptado para publicación: 30 abril 2024



INTRODUCCION

La Ehrlichiosis es una enfermedad infecciosa importante transmitida por garrapatas en perros y otros cánidos, con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales. La Ehrlichiosis es causada por *Ehrlichia canis* (*E. canis*), bacterias gramnegativas obligadas que infectan monocitos, granulocitos y plaquetas (Abdelfattah y col., 2019). El diagnóstico preciso de esta enfermedad es fundamental para su manejo clínico y control. En este contexto, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser una herramienta eficaz para la detección molecular de *E. canis*, permitiendo una identificación específica y sensible de la bacteria en muestras clínicas de perros infectados (Lapo, 2022; Gutiérrez y col., 2022). Los ensayos por IFI son considerados el estándar de oro para el diagnóstico de CME y HME, pero éstos no pueden diferenciar anticuerpos contra las diferentes especies de *Ehrlichia*, ya que se ha reportado reactividad cruzada entre *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, así como con *Anaplasma phagocytophilum*, pudiendo generar falsos positivos y ocasionar que el agente etiológico de la infección no sea determinado (Franco y Col.,2019). El valor de sensibilidad de esta prueba dependerá de las semanas transcurridas desde el inicio de la infección, teniendo valores entre 82 y 100%, mientras que, la especificidad, oscila entre 67 y 100% debido a la reactividad cruzada que se presenta (Franco y col.,2019). De igual manera, estos dos parámetros pueden variar con base en la composición de los antígenos utilizados, así como el formato de la prueba, ya que utilizar proteínas recombinantes, sintéticas o microorganismos completos provenientes de cultivo, puede causar diferencias en la reactividad antígeno-anticuerpo afectando los valores de sensibilidad y especificidad (Franco y col.,2019). Las PCRs anidadas mejoran la especificidad y sensibilidad del ensayo de PCR para *Ehrlichia* spp. (Dawson y col., 1996, Breitschwerdt y col, 1998, Murphy y col., 1998). En la PCR anidada cebadores géneros específicos se utilizan en la primera reacción para detectar ADN Ehrlichial, mientras que los cebadores especie específicos se utilizan en la segunda reacción para diferenciar entre las distintas especies (Kelly, 2000). En la PCR de un solo paso se ha utilizado cebadores que permiten la amplificación de todas las especies de *Ehrlichia* provenientes de muestras de sangre y tejidos (Iqbal y col., 1994). La variabilidad genética de *Ehrlichia canis* es un aspecto crucial a considerar en el diagnóstico molecular, ya que diferentes regiones geográficas pueden albergar variantes genéticas específicas de la bacteria. Estas variantes moleculares pueden influir en la eficacia de las pruebas de



PCR y en la interpretación de los resultados. Por lo tanto, es fundamental investigar y comprender las posibles variantes moleculares de *E. canis* presentes en una región determinada para mejorar la precisión del diagnóstico y la comprensión de la epidemiología de la Ehrlichiosis canina (Aragón y col., 2021; Castro, 2012). En esta publicación científica, se abordó la importancia del diagnóstico molecular por PCR de *Ehrlichia canis*, considerando las posibles variantes moleculares que pueden surgir en una región específica. Se analizó la relevancia de la detección precisa de estas variantes genéticas para mejorar la eficacia del diagnóstico y la comprensión de la diversidad genética de *E. canis* en el contexto de la Ehrlichiosis canina.

METODOLOGIA

Recolección y procesamiento de las muestras para inmunocromatografía Kit -test (IC)

Para el presente estudio se seleccionó un total de 120 muestras de perros que llegaron a consulta a la veterinaria “Hervás” del cantón Camilo Ponce Enríquez (Ecuador), los mismos que presentaban sintomatología clínica compatible con Ehrlichiosis canina y además presentaban antecedentes de garrapatas. Las muestras de sangre se obtuvieron desde la vena cefálica y las mismas fueron transferidas rápidamente a un tubo con EDTA, homogeneizadas y conservadas a temperatura ambiente hasta su utilización. Inmediatamente extraídas las muestras se aplicó el Test kit de inmunocromatografía SensPERT (CHW Ag/Anaplasma Ab /E. Canis Ab/Lyme Ab - VetAll Laboratories, Corea Del Sur). Todas las muestras positivas a IC fueron sometidas a PCR convencional en un solo paso.

Detención molecular del ADN de *E. Canis*

El ADN fue extraído del plasma sanguíneo de los perros examinados utilizando el kit comercial de extracción de ADN (Quick- DNA Microprep w/ Zymo Spin, Irvine, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso en el ensayo de PCR. Se llevó a cabo una prueba de PCR dirigida al gen 16S rRNA de *E. canis* utilizando pares específicos de cebadores en todas las muestras de sangre para detectar la presencia de *E. canis*. La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 µl. En donde la mezcla se realizó utilizando 0,6 µl del primer forward (CANIS 5'-CAA-TTA-TTT-ATA-GCC-TCT-GGC-TAT AGG-A-3'), 0,6 µl del primer reverse (GA1UR 5'-GAG-TTT-GCC-GGG-ACT-TCT-TCT-3') a una concentración de 100 pmol/µl, 6,3 µl de H₂O µl y 12,5 µl de Taq 2X PCR Master Mix (abm, Canadá) y finalmente se agregó 5,0 µl de ADN templado. El



procedimiento del termo ciclado fue el siguiente: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 sec a 95 °C, 30 sec a 62 °C, luego 1 ciclo de 1 min a 72°C y finalmente 1 ciclo de 5 min a 72° C. Para la visualización del resultado de PCR amplificados se realizó en gel de agarosa al 1.5 %, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb.

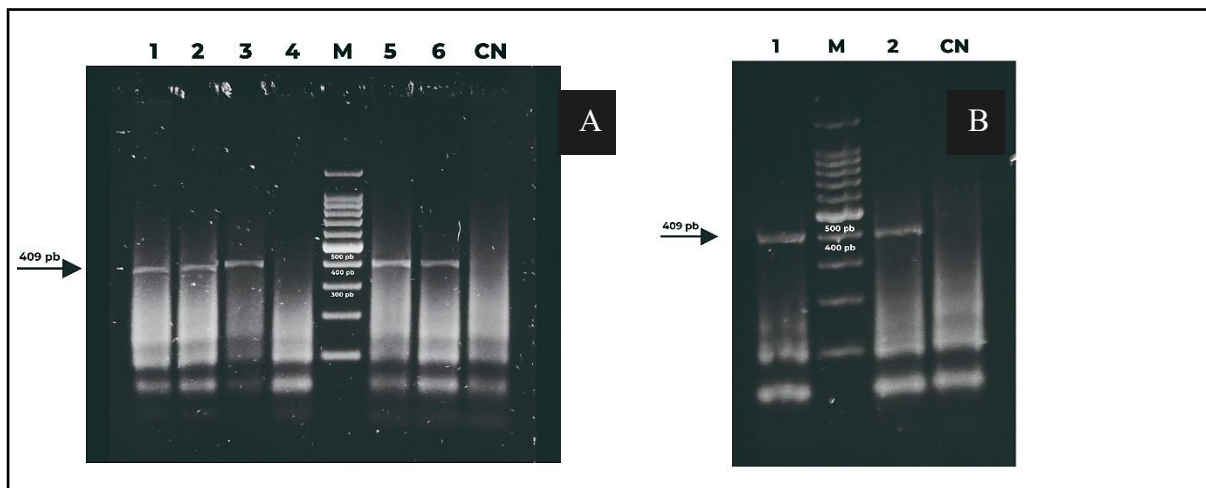
Análisis estadístico

Todos los datos fueron manejados en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2016. Y se utilizó la prueba de ji-cuadrado con una confiabilidad del 95 %, utilizando el software estadístico SPSS versión 22, para probar la importancia de la seroprevalencia y diferencias regionales, con $p < 0,05$ como nivel mínimo de significación estadística.

RESULTADOS Y DISCUSION

El resultado evidencio que a partir de 120 pacientes caninos sintómicamente compatibles con Ehrlichiosis canina, 45 animales resultaron positivos al kit de inmunocromatografía (45/145), dando una prevalencia de 37,5% de positividad a la presencia de anticuerpos a *E. canis*. Se demostró la amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para *E. canis* en 14 animales de un total de 45 positivos a IC, dando una tasa de infección del 31,11%, con un amplicón de 409 pb de producto final como se muestra en la figura 1 (A/B).

Figura 1



(A) Amplificación del gen 16S rRNA a partir del ADN de algunos perros examinados, aproximadamente 409 pb. Carril 1-3 muestras positivas (409 pb); carril 4 muestra negativa; marcador molecular (carril M); carril 5-6 muestras positivas (409 pb) y carril CN control negativo. (B) El carril 1 y 2 muestran el producto obtenido con lo cebadores CANIS 5' y GA1UR para *E. canis* ; el carril M muestra la escalera de 100 pb de marcador molecular y el carril CN el resultado de la mezcla sin añadir ADN molde.

Los valores encontrados en la tasa de infección de *E. canis* con relación a la edad, sexo y raza no fueron significativos (p -valor >0.005), lo cual no encontrar diferencias podemos indicar que estas condiciones no afectan de ninguna forma la incidencia de la enfermedad y su positividad. Sin embargo, resultados obtenidos para la detección de ehrlichiosis en diferentes razas, demostraron que *E. canis* puede infectar a todas las razas de perros, pero una mayor tasa de infección en las razas alemanas en comparación a otras razas (Abdelfattah y col., 2019). Por otra parte (Cañar y col., 2023) reportaron en un estudio de PCR, una tasa de incidencia mayor en caninos mestizos. Martínez y col., (2015) en Venezuela indicaron que el análisis serológico en busca de anticuerpos IgG anti – *E. canis* de 110 pacientes muestreados presentaron 85 muestras positivas con un (77,3%) de prevalencia, corroborando con datos similares se presenta Rivas y col.,2010, en Nicaragua donde realizaron un estudio de 27 muestras de un ensayo de IC, obteniendo un total de 17 animales positivos (63%). Datos diferentes en estudios de IC se presentaron en Lima – Perú, quienes indicaron que, de un total de 1216 animales muestreados, 723 pacientes dieron positivos *E. canis* 59,4% (Cusicanqui, J y Zuñiga R, 2020), estos resultados demuestran la aplicabilidad de la prueba de IC en investigación diagnóstica veterinaria para *E. canis*.

La presencia de Ehrlichiosis ha sido detectada y reportada en perros en diferentes partes de Latinoamérica con prevalencias similares a las encontradas en este estudio como la de Colombia con un 33,3% (Bonilla y col., 2012). En el Ecuador existen muy pocos trabajos publicados sobre diagnóstico molecular de *E. canis* y dándole principal consideración por tratarse de una enfermedad con capacidad de coinfección con otros tipos de patógenos (Chalco y col., 2023). Estudios confirmaron la sensibilidad de la PCR y las limitaciones de pruebas de diagnóstico como exámenes microscópicos e IC diagnósticos. Trabajos realizados en otras localidades hacen referencia de la sensibilidad del PCR, como lo indica (Cañar y col., 2023), en donde de 24 pacientes analizados por PCR, 18 muestras dieron positivas a *E. canis* (52,94%) y (Rodríguez y col., 2020) en la ciudad de México con 28 pacientes de resultados positivos a *E. canis* mediante PCR con un 47,45%.

CONCLUSIONES

El presente estudio confirma la presencia de *E. canis* entre los perros del cantón Ponce Enríquez (Ecuador), La implementación de la PCR en un solo paso para el diagnóstico de la Ehrlichiosis Canina se realizó con éxito en el presente trabajo y se propone esta técnica como prueba confirmatoria para el



diagnóstico de la enfermedad en nuestros pacientes. Así mismo se recomienda realizar encuestas epidemiológicas de la patología en otras localidades para planificar medidas de control de la enfermedad entre los perros. Y se debe tener en consideración la necesidad de estudios adicionales para la tipificación molecular y el análisis filogenético de la bacteria *E. canis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ahmed S; Abdelfattah S; Elsayed G. Benha Veterinary Medical Journal Epidemiological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* infection among dogs. Vol. 37, Benha Veterinary Medical Journal. 2019
2. Aragon, C. *et al.* Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* en caninos domésticos del municipio de Cajeme, Sonora, México. ABANICO VETERINARIO ISSN 2448-6132. 2021
3. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1998.
4. Carrillo Bonilla, Lina María, Betancur Cardona, Sara, Roldán Cardona, Daniel, Pérez Jaramillo, Juan Esteban, Galeano Rivera, Daniel, Loaiza Echeverría, Érica Tatiana, & Giraldo Echeverría, Carlos Andrés. (2012). Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 38-46. Retrieved April 13, 2024, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072012000200005&lng=en&tlng=es
5. Castro, M. Arocha, F. Diagnóstico serológico y molecular de Ehrlichiosis humana en pacientes con sintomatología clínica compatible con la enfermedad en el estado Zulia Venezuela 2004-2005. Kasma. 2012.
6. Chalco-Torres LE, Guerrero-López AE, Sánchez-Prado RG, Pérez Rodríguez JE, Oliveira C, Gómez JA, et al. Detección molecular de coinfección por *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii* en un perro en Ecuador. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 2023 Feb 11;XXXIII(1):1-6.



7. Cañar-Romero PM, Vallecillo-Maza AJ, Castillo-Hidalgo EP. Detección de material genético mediante reacción en cadena de polimerasa en muestras de caninos seropositivos a Ehrlichia canis. MQRInvestigar. 2023;7(2).
https://www.researchgate.net/publication/371029627_Deteccion_de_material_genetico_mediante_reaccion_en_cadena_de_polimerasa_en_muestras_de_ca
8. Cusicanqui S J, Zúñiga F. R. Frecuencia serológica de Ehrlichia canis en caninos sospechosos de ehrlichiosis en los distritos de Lima Norte, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2020;31(3). <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v31n3/1609-9117-rivep-31-03-e18164.pdf>
9. CHW Ag/Anaplasma Ab/E.canis Ab/LSH Ab Test Kit
https://vitavet.mk/wp-content/uploads/2023/08/ai39_chwag-anaplsmaab-e.canisab-lshab_information_2020.pdf
10. Dawson JE, Warner CK, Baker V, Ewing SA, Stallknecht DE, Davidson WR, et al. Ehrlichia-like 16S rDNA Sequence from Wild White-Tailed Deer (Odocoileus virginianus) [Internet]. Vol. 82, Source: The Journal of Parasitology. 1996. Available from:
<http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/3284115>
11. Franco-Zetina Manuel, Adame-Gallegos Jaime, Dzul-Rosado Karla. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2019 Oct [citado 2024 Ene 24] ; 36(5): 650-655. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>.
12. Gutierrez CN, Perez Yabarra L, agrela IF. Ehrlichiosis Canina. Saber. 2016;28(4).
13. Inokuma, H., Parola, P., Raoult, D., & Brouqui, P. (2001). Molecular survey of Ehrlichia infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Veterinary parasitology*, 99(4), 335–339.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00470-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00470-8)
14. Kelly PJ. Canine ehrlichioses: an update. 2000.
15. Lapo Gaona JA, Reyna Bello A. Identificación y caracterización molecular de Ehrlichia canis en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas. Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura. 2022.



16. Martínez A. M del C, Arraga-Alvarado CM, Triana-Alonso FJ, Ruiz C. JA, Gutiérrez G. CN. Estudio Serológico y Molecular de Ehrlichia canis en Perros de una Comunidad del Estado Aragua, Venezuela. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2015;26(4).
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n4/a12v26n4.pdf>
17. Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. 1998.
18. Rodríguez-Alarcón CA, Beristain-Ruiz DM, Olivares-Muñoz A, Quezada-Casasola A, Pérez-Casio F, Álvarez-Martínez JA, et al. Demonstrating the presence of Ehrlichia canis DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. Parasit Vectors. 2020
<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04363-0>
19. Rivas V; Morales D; Saenz M; Bonilla J. Hallazgo de Ehrlichiosis canina causada por E. canis en una Comunidad del Municipio de León, Nicaragua. REDVET Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 Número 03. 2010;11:2–11.
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63613123002.pdf>

