

Detection of genetic material by polymerase chain reaction in *Ehrlichia canis* seropositive canine samples

Detección de material genético mediante reacción en cadena de polimerasa en muestras de caninos seropositivos a *Ehrlichia canis*

Autores:

Cañar-Romero, Paola Mariana
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, ECUADOR
Cuenca-Ecuador



paola.canar.12@est.ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0000-0001-9535-4685>

Vallecillo-Maza, Antonio Javier
UNIVERSIDAD ESTATAL DE CUENCA, ECUADOR
Docente Titular
Cuenca-Ecuador



antonio.vallecillo@ucuenca.edu.ec



<https://orcid.org/0000-0001-9141-0176>

Castillo-Hidalgo, Edy Paul, MsC
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, ECUADOR
Profesor del Posgrado en Medicina Veterinaria, Mención Clínica y Cirugía de Pequeñas Especies
Cuenca-Ecuador



ecastilloh@ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0000-0002-8695-5005>

Citación/como citar este artículo: Cañar-Romero, Paola Mariana., Vallecillo-Maza, Antonio Javier. y Castillo-Hidalgo, Edy Paul. (2023). Detección de material genético mediante reacción en cadena de polimerasa en muestras de caninos seropositivos a *Ehrlichia canis*. MQRInvestigar, 7(2), 1188-1200.

<https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.2.2023.1188-1200>

Fechas de recepción: 24-ABR-2023 aceptación: 24-MAY-2023 publicación: 15-JUN-2023



<https://orcid.org/0000-0002-8695-5005>
<http://mqrinvestigar.com/>



Resumen

La Ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es causada por *Ehrlichia canis*, enfermedad transmitida por garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus*, su presentación clínica puede variar desde la fase aguda hasta una fase crónica, en América Latina existen varios estudios sobre ehrlichiosis en donde se considera una infección zoonótica emergente en humanos. El objetivo de esta investigación es aplicar la prueba de PCR convencional (cPCR) en muestras de caninos seropositivos al test rápido CaniV-4 de BioNote en la ciudad de Naranjal (Guayas-Ecuador) con el fin de detectar material genético de *Ehrlichia canis* y determinar la frecuencia de animales positivos a Ehrlichiosis canina. La siguiente investigación se basa en un diseño observacional, descriptivo de tipo transversal, bajo un enfoque cuantitativo. En donde se implementó como técnica diagnóstica el uso de cPCR para la detección de material genético de *Ehrlichia canis* en muestras de caninos seropositivos mediante el test rápido CaniV-4. Se analizó 34 muestras de caninos mediante cPCR y se detectó material genético de *Ehrlichia canis* en 18 muestras (52,94%) y en 16 muestras (47,05%) no se detectó material genético en cPCR. Por lo tanto la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas rápidas debe realizarse con precaución ya que estas se limitan a detectar anticuerpos y no la presencia del patógeno; usar un test rápido basado en inmunocromatografía no da un resultado confiable para el diagnóstico y menos aún como control después del tratamiento de la *Ehrlichiosis*.

Palabras clave: Ehrlichiosis canina; biología molecular; zoonosis; hemoparásitos; perros.

Abstract

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is caused by *Ehrlichia canis*, a disease transmitted by ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus*. Its clinical presentation can vary from acute to chronic phases. In Latin America, there are several studies on ehrlichiosis, where it is considered an emerging zoonotic infection in humans. The objective of this research is to apply conventional PCR (cPCR) testing on seropositive canine samples from the BioNote CaniV-4 rapid test in the city of Naranjal (Guayas-Ecuador) to detect genetic material of *Ehrlichia canis* and determine the frequency of positive animals for canine ehrlichiosis.

This study is based on an observational, cross-sectional design, using a quantitative approach. The cPCR technique was implemented as the diagnostic method to detect genetic material of *Ehrlichia canis* in seropositive canine samples using the CaniV-4 rapid test. A total of 34 canine samples were analyzed using cPCR, and genetic material of *Ehrlichia canis* was detected in 18 samples (52.94%), while no genetic material was detected in 16 samples (47.05%). Therefore, the interpretation of rapid diagnostic test results should be done with caution, as they are limited to detecting antibodies and not the presence of the pathogen. Using a rapid test based on immunochromatography does not provide a reliable result for diagnosis, especially as a post-treatment control for Ehrlichiosis.

Keywords: Canine ehrlichiosis; molecular biology; zoonosis; hemoparasites; dogs.

Introducción

La ehrlichiosis es una enfermedad causada por varias especies de ehrlichia, entre ellas se encuentran *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffeensis*, es una bacteria gramnegativa intracelular estricta, transmitida por garrapatas principalmente de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Guenduaín et al., 2020), la ehrlichiosis es una patología que se ha registrado en todo el mundo, con mayor frecuencia en las regiones tropicales y subtropicales (Harrus & Waner, 2011).

La Ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es causada por *Ehrlichia canis*, ésta se caracteriza por afectar a integrantes de la familia Canidae (Vicente, 2017) y su presentación clínica puede variar desde la fase aguda hasta una fase crónica, la presencia de síntomas depende de la fase en la que se encuentra la enfermedad y de la respuesta del sistema inmune de los caninos. Esta patología puede agravarse si viene acompañado con otros hemopatógenos concomitantes como anaplasma y dirofilaria, que suelen ser transmitidos por el mismo vector (Zetina et al., 2019).

En América Latina existen varios estudios sobre ehrlichiosis, al parecer la combinación de factores medioambientales, junto con la biodiversidad ha creado un ambiente amigable para poblaciones de parásitos y vectores, siendo la gran mayoría hospedadores o causantes de enfermedades que son de importancia para la salud pública (Martínez et al., 2015); (Guerrero Puentes, 2016); (Navarajo, 2021); (Cabrera & Monsalve, 2020).

Se debe tomar en cuenta que *E. ewingii*, *E. canis* y *E. muris subsp. eauclairensis* se han identificado como agentes causantes de infecciones zoonóticas emergentes en humanos, y se sabe que los tres primeros agentes también causan ehrlichiosis en perros. *Ehrlichia canis* se ha asociado a infecciones humanas en Venezuela y Costa Rica mediante pruebas serológicas y moleculares, por lo cual es una enfermedad de importancia pública por su potencial zoonótico (Forero-Becerra et al., 2021)

En Ecuador se ha podido identificar anaplasmosis, ehrlichiosis y dirofilariosis de forma concomitante, dado que estas enfermedades son transmitidas por vectores invertebrados similares, la mayoría de diagnósticos para estas enfermedades se realizan mediante técnicas de inmunodiagnóstico, visualización microscópica, tests rápidos y pocas veces se utilizan técnicas de diagnóstico molecular (Dávalos & Melchiade, 2018).

Entre los métodos más novedosos de diagnóstico molecular encontramos la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Vicente, 2017), ésta técnica sintetiza varias veces un fragmento de ADN mediante una polimerasa que soporta temperaturas altas (79°C a 85°C) (Espinosa Asuar, 2007). Una vez que se obtiene el producto de la PCR, se necesita un análisis secundario, como una electroforesis en gel, para su detección, la identificación definitiva suele requerir el análisis de la secuencia genómica u otros métodos alternativos (Xia et al., 2018).

Harrus y Waner (2011) habla sobre la poca especificidad que tienen los métodos de diagnóstico clásicos para la detección de la *E. canis*, por lo que cita la importancia del uso de pruebas de diagnóstico más recientes basadas en métodos de biología molecular y los métodos de serología basados en antígenos específicos que tienden a ser más sensibles.

El objetivo de esta investigación es aplicar la prueba de PCR convencional (cPCR) en muestras de caninos seropositivos al test rápido CaniV-4 de BioNote en la ciudad de Naranjal (Guayas-Ecuador), con el fin de detectar material genético de *Ehrlichia canis* y determinar la frecuencia de animales positivos a Ehrlichiosis canina.

Material y métodos

Material

La investigación se basó en un diseño observacional y descriptivo de tipo transversal, con un enfoque cuantitativo. Se utilizó la técnica diagnóstica de cPCR para detectar el material genético de *Ehrlichia canis* en muestras de caninos seropositivos mediante el test rápido CaniV-4 de BioNote. Las muestras se recolectaron de caninos domésticos que acudieron a la clínica veterinaria "Luna" en el cantón Naranjal de la provincia del Guayas.

Se seleccionaron animales con clínica compatible para la Ehrlichiosis canina, presencia o antecedentes de infestación de garrapatas y resultados positivos en el test rápido de *Ehrlichia canis*. Se recolectaron un total de 52 muestras entre septiembre y octubre de 2022. De estas, 18 muestras fueron excluidas debido a que los animales estaban bajo tratamiento para la Ehrlichiosis canina o por errores en el almacenamiento o toma de muestras. En última instancia, el estudio se llevó a cabo con muestras de 34 caninos domésticos que cumplían todos los criterios de inclusión.

Métodos

Se tomaron 2 mililitros (ml) de sangre de la vena cefálica, sin anticoagulante, y 1 ml de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA. Estas muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su recolección y luego se conservaron a -15°C hasta su procesamiento.

Para el análisis, se utilizó 250 µl de sangre entera contenida en los tubos al vacío con EDTA, que previamente se había refrigerado a -15°C. La extracción del ADN se realizó utilizando el kit de extracción PureLink Genomic DNA mini kit de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, se tomaron 23 microlitros de la premezcla y se combinaron con 2 microlitros de las muestras sospechosas de *Ehrlichia canis*. Estas mezclas se sometieron al siguiente perfil de temperaturas en el termociclador marca Eppendorf Mastercycler Nexus Gsx1.

Tabla 1

Perfil de temperaturas

Paso:	Tiempo (min' seg''):	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	05'00''	94
37 ciclos	Desnaturalización	00'25''
	Alineamiento	00'25''
	Extensión	00'30''
Extensión final	05'00''	72
Almacenamiento	∞	20

Nota: Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de *Ehrlichia canis*

Fuente: De los autores

Resultados

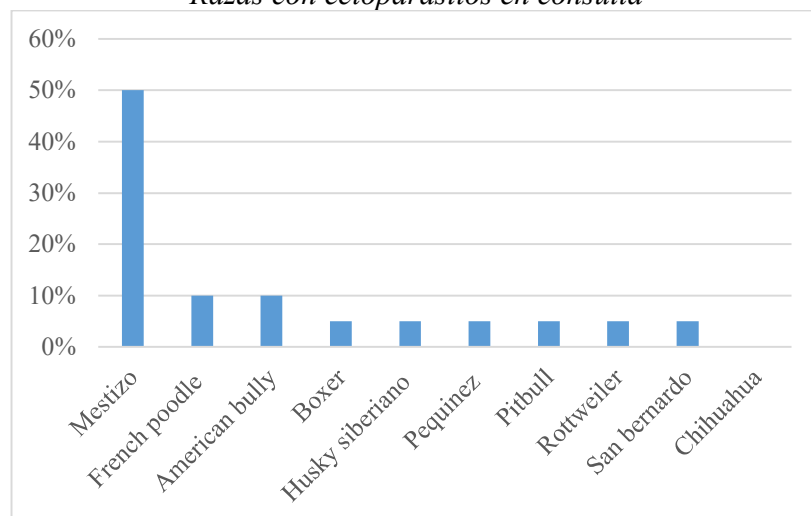
De las 34 muestras sanguíneas seleccionadas, 16 (47%) corresponden a hembras y 18 (53%) a machos, con edades que varían desde 4 meses hasta 10 años. La distribución de las razas fue la siguiente: mestizos 12 (35.29%), Husky siberiano 4 (11.76%), Boxer 1 (2.94%), Pequinés 3 (8.82%), Rottweiler 2 (5.88%), Chihuahua 2 (5.88%), American Bully 2 (5.88%), Pitbull 5 (14.70%), French Poodle 2 (5.88%) y San Bernardo 1 (2.94%).

Todas estas muestras cumplían con los criterios de inclusión, lo que significa que presentaron signología compatible con la Ehrlichiosis canina. Además, algunos de los animales tenían la presencia o antecedentes de infestación de garrapatas. Cabe destacar que el 100% de las muestras (34/34) resultaron positivas para *Ehrlichia canis* en la prueba rápida CaniV-4.

De los 34 animales seropositivos, se encontró evidencia de garrapatas en el momento de la consulta en 20 pacientes, lo que representa un 58.82% del total.

Gráfico 1

Razas con ectoparasitos en consulta



Nota: Razas de pacientes caninos con presencia de garrapatas en consulta.

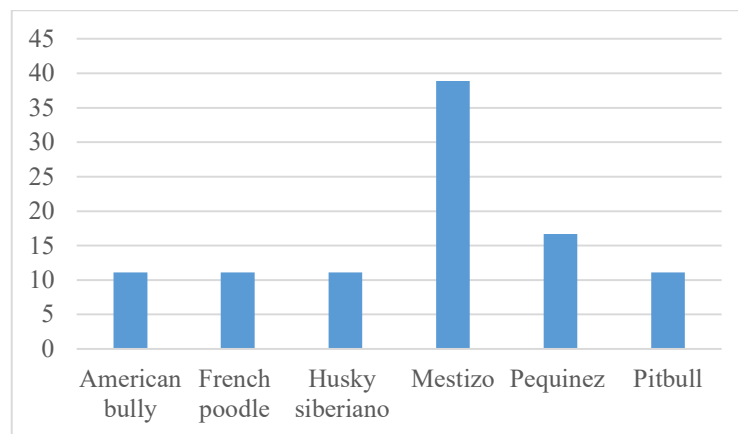
Fuente: Datos demográficos de la población estudiada en Naranjal.

El gráfico número 1 muestra la presencia de garrapatas en diferentes razas de animales durante la consulta. Según los datos recopilados, se observa que los animales con garrapatas se distribuyeron de la siguiente manera: Mestizos 10 (50%), French Poodle 2 (10%), American Bully 2 (10%), Boxer 1 (5%), Husky Siberiano 1 (5%), Pequinés 1 (5%), Pitbull 1 (5%), Rottweiler 1 (5%), y San Bernardo 1 (5%). Es importante destacar que no se registró ninguna presencia de garrapatas en Chihuahuas durante la consulta.

Las 34 muestras de caninos fueron analizadas mediante cPCR se detectó material genético de *Ehrlichia canis* en 18 muestras (52,94%) y en 16 muestras (47,05%) no se detectó material genético en cPCR.

Gráfico 2

Razas de pacientes positivos a cPCR



Nota: Razas de pacientes caninos que resultaron positivos a la cPCR.

Fuente: Datos del laboratorio de biología molecular.

En el gráfico número 2 se pueden observar las razas de los animales que dieron positivo en la prueba de cPCR. Estos animales incluyen American Bully 2 (11,11%), French Poodle 2 (11,11%), Husky Siberiano 2 (11,11%), Mestizos 7 (38,88%), Pequinés 3 (16,66%) y Pitbull 2 (11,11%).

De las muestras positivas en la prueba de cPCR, un 77,77% (14/18) presentaron garrapatas al momento de la consulta. Sin embargo, se encontró que un 25% (4/16) de los pacientes con resultados negativos también estaban infestados por garrapatas. Por lo tanto, los perros con presencia de garrapatas tienen una mayor probabilidad de dar positivo en la prueba de cPCR y en los test rápidos para *E. canis*.

Discusión

Harrus & Waner, (2011) concluyen que el diagnóstico de la EMC debe realizarse a la luz de la anamnesis en conjunto con los signos clínicos y los resultados de las pruebas de laboratorio. La mayoría de diagnósticos para estas enfermedades se realizan mediante técnicas de inmunodiagnóstico, visualización microscópica, tests rápidos y pocas veces se utilizan técnicas de diagnóstico molecular (Dávalos & Melchiade, 2018). El estudio de

Wichianchot et al., (2022) aplicó dos técnicas de PCR y frotis sanguíneos a 92 muestras de campo positivas a *Ehrlichia canis* mediante cPCR las cuales se muestran que el mayor número de casos positivos se encontraron mediante PCR digital en gota (ddPCR) en un 50% (46/92), mientras que en la cPCR sólo produjo un 34% (31/92) y los frotis sanguíneos sólo un 13% (12/92). La técnica de ddPCR es una herramienta poderosa para evaluar con precisión el número de *E. canis* debido a que tiene el límite de detección (LODs) mucho más bajo que la cPCR. Sin embargo, concluyen que la cPCR sigue siendo eficaz para el diagnóstico rutinario. El alto rendimiento de las técnicas de PCR puede complementar los exámenes microscópicos, ya que éstos tienen una menor sensibilidad.

En un estudio donde se analizaron 510 muestras de suero, 293 (57,5%) casos resultaron positivos a la presencia de anticuerpos contra *E. canis* mediante ELISA. De las 510 muestras analizadas por PCR, 45 (8,8%) resultaron positivas para *E. canis* demostrando así que la PCR es normalmente más sensible que el ELISA (Kukreti et al., 2018). En este estudio analizamos 34 caninos domésticos positivos a ensayo de inmunocromatografía (Caniv-4 de BioNote) los mismos fueron sometidos a cPCR y se detectó material genético de *Ehrlichia canis* en 18 muestras (52,94%) y en 16 muestras (47,05%) no se detectó material genético, por lo que mantenemos que el PCR es un método más sensible para la detección de *E. canis*, discrepando con Zetina et al., (2019) que menciona que los métodos serológicos por medio de pruebas comerciales resultan efectivos para el diagnóstico de *E. canis*, siendo uno de los mejores la prueba SNAP 4Dx® Plus. Según los fabricantes del SNAP 4Dx® Plus es una prueba basada en ELISA que sirve para detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Borrelia burgdorferi* y recomiendan pruebas adicionales en estos pacientes para determinar si existe una infección activa (IDEXX Laboratories, 2022). La desventaja del uso de pruebas basadas en detección de anticuerpos solo prueban la exposición a *E. canis* más no una infección activa, sabiendo que los anticuerpos pueden durar meses o años después de la administración del tratamiento y de la eliminación de la bacteria (Gutiérrez et al., 2016). Se debe considerar también que los anticuerpos contra varios organismos ehrlichiales presentan reacción cruzada con *E. canis* por lo que complican el diagnóstico serológico de la EMC (Harrus & Waner, 2011).

En este estudio el mayor porcentaje de raza afectada con *E. canis* fue la Mestiza con el 38,88%, evidenciando así que la mayor presencia de *Ehrlichia canis* fue en perros mestizos, esto concuerda con el estudio de Lina et al. (2015) que incluyó 57 razas caninas, siendo más frecuentes los criollos con 103 animales que representan el 13,2 % (Lina et al., 2015). En estos dos estudios los animales más afectados son mestizos o criollos esto puede atribuirse a la ausencia de cuidados preventivos, el hábitat, ausencia de tutores y convivencia con animales de granja, haciéndolos así más susceptibles a diferentes vectores y enfermedades. Un estudio en Tailandia evaluó 70 garrapatas recogidas de 70 perros enfermos, 55 (78,57%) resultaron positivas a patógenos transmitidos por garrapatas. La infección más común fue *Hepatozoon canis* (65,71%), seguida de *Babesia spp.* (31,43%) y *Ehrlichia canis* (30,00%)

(Eamudomkarn et al., 2022). En nuestro estudio el 77,77 % (14/18) de pacientes con resultado positivo a *Ehrlichia canis* en la cPCR tuvieron presencia de garrapatas al momento de la consulta, si bien no se evaluaron directamente las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* hay que considerar que estos ectoparásitos albergan múltiples patógenos que afectan a humanos y caninos. En el caso particular por *Ehrlichia canis* cada vez se diagnostican más infecciones humanas reportadas en algunos países, donde factores como la presencia y el número de animales reservorio y garrapatas vectoras podrían desempeñar un papel fundamental en las infecciones emergentes, como ejemplo en un estudio realizado en Venezuela se evaluó un total de 20 pacientes humanos con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis monocítica humana (EMH), que ingresaron de emergencia del estado Lara, el 30% (6/20) de los pacientes fueron positivos para *Ehrlichia canis* en la PCR del gen específico 16S rRNA, tres de los pacientes tenían perros en casa y dos de ellos trabajaban en zonas rurales (agricultores o ganaderos), Venezuela es un país tropical con una gran abundancia de garrapatas y un alto nivel de infección de *E. canis* en perros (Perez et al., 2006), estos resultados apoyan que los factores medioambientales más el número de animales reservorio que no son tratados elevan las probabilidades de adquirir patógenos transmitidos por garrapatas a humanos. Por otro lado un estudio en Colombia recolectó 506 muestras de sangre de residentes sanos y 114 muestras de sangre de perros de cuatro municipios en donde se evaluaron anticuerpos contra *E. canis* en suero humano y canino mediante ELISA del péptido de la proteína 19 repetida en tándem (TRP19) y ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en este estudio detectaron anticuerpos contra *Ehrlichia canis* TRP19 en 1/506 sueros humanos, pero la única muestra positiva dio negativo por IFI, por lo cual los autores concluyen que no hubo evidencia serológica de infección por *E. canis* en humanos, por lo que sugieren que la infección por *E. canis* en perros del Cauca no está asociada con infección zoonótica humana.

Conclusiones

Con la aplicación del ensayo de cPCR en 34 muestras seropositivas, se logró la amplificación de material genético de *Ehrlichia canis* en 18 muestras (52,94%), mientras que las 16 muestras restantes (47,05%) resultaron negativas. Estos resultados destacan la importancia de interpretar con precaución los resultados de las pruebas diagnósticas rápidas, ya que estas pruebas se limitan a detectar anticuerpos y no la presencia del patógeno en sí.

Es importante tener en cuenta que el uso de pruebas rápidas basadas en inmunocromatografía no proporciona resultados confiables para el diagnóstico de la Ehrlichiosis, ni tampoco para su uso como control después del tratamiento. No se recomienda confiar en los resultados de estas pruebas mucho tiempo después de dar de alta al paciente, ya que los anticuerpos pueden

persistir durante varios años y no necesariamente indican una infección activa que requiera un nuevo tratamiento antibiótico.

Es crucial recordar que el uso inapropiado de antibióticos solo promueve la resistencia bacteriana y existen pocos antimicrobianos eficaces para tratar la Erliquiosis canina. Por lo tanto, el control de las enfermedades infecciosas requiere la disponibilidad de herramientas diagnósticas más sensibles y específicas para detectar los patógenos, junto con medidas de prevención adecuadas. En el caso de *E. canis*, el control de ectoparásitos es fundamental para minimizar las posibilidades de contagio tanto en caninos como en humanos.

Referencias bibliográficas

Cabrera, A., & Monsalve, S. (2020). Circulación de microorganismos de interés clínico transmitidos por garrapatas en poblaciones de caninos domésticos en Latinoamérica. En S. Posada, A. Cabrera, & S. Monsalve (Eds.), *Enfermedades rickettsiales en Latinoamérica* (pp. 101-122). Ciudad de publicación: Colombia.

Dávalos, S., & Melchiade, J. (2018). Diagnóstico de ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariosis y enfermedad de Lyme y caracterización de vectores en caninos callejeros del sector Guasmo Sur –Guayaquil. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15099>

Eamudomkarn, C., Pitaksakulrat, O., Boueroy, P., Thanasuwan, S., Watwiengkam, N., Artchayasawat, A., & Boonmars, T. (2022). Prevalence of Ehrlichia-, Babesia-, and Hepatozoon-infected brown dog ticks in Khon Kaen Province, Northeast Thailand. *Veterinary World*, 15(7), 1699–1705. Recuperado de: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1699-1705>

Espinosa Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Recuperado de: <https://criminalistica.mx/descargas/documentos/pdf/PCR%20guia.pdf>

Forero-Becerra, E., Patel, J., Martinez-Diaz, H. C., Betancourt-Ruiz, P., Benavides, E., Duran, S., Olaya-Masmela, L. A., Bolaños, E., Hidalgo, M., & McBride, J. W. (2021). Seroprevalence and genotypic analysis of Ehrlichia canis infection in dogs and humans in Cauca, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(5), 1771–1776. Recuperado de: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0965>

Guenduain, C., Tamiozzo, P., Bessone, A., Caffaratti, M., Giménez, F., Cabello, S., & Bonacci, M. (2020). Detección molecular de Ehrlichia canis en perros de diferentes

localidades de la provincia de Córdoba, Argentina. *Ab Intus*, 4(26), 18–34. Recuperado de: http://www.ayv.unrc.edu.ar/ojs/index.php/Ab_Intus/article/view/31

Guerrero Puentes, 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). Recuperado de: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/632>

Gutiérrez, C. N., Pérez-Ybarra, L., & Agrela, I. F. (2016). Ehrlichiosis canina. *Veterinaria*, 28, 641–665. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427751143001>

Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, 187(3), 292–296. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>

IDEXX Laboratories. (2022). Prueba SNAP 4Dx Plus. Recuperado de: https://www.idexx.com/media/filer_public/f6/63/f663df07-e5ba-4b10-b7e6-a144b5b99034/snap-4dx-plus-test-accuracy.pdf

Kukreti, Das, K., Rastogi, M. K., Dubey, A. K., Pandey, R., & Sharma. (2018). Prevalence of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Canine Population Across India. *Archives of Razi Institute*, 73(2). Recuperado de: https://archrazi.areeo.ac.ir/article_116616_f4a2c46194f5f0e08f7b2a1e8353fbdf.pdf

Lina, M., Cartagena, Y., Osorio, L., Ríos, A., Arias, J., & Cardona, A. (2015). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Dogs with Suspected Infection by Tick-Borne Pathogens in Medellín. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542015000100006

María Del Carmen Martínez, A., Arraga-Alvarado, C. M., Triana-Alonso, F. J., Johanny Alejandra Ruiz, C. M., & Clara Nancy Gutiérrez, G. (2015). A serological and molecular survey of *ehrlichia canis* in dogs from a community in Aragua State, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 26(4), 648–656. Recuperado de: <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11220>

Navarajo, J. (2021). Determinación de la presencia de *Ehrlichia canis* en caninos con historia de garrapatos, en una clínica veterinaria del municipio de San Miguel de Petapa, Guatemala, durante agosto y septiembre 2020. Recuperado de: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/16161/1/Tesis%20Med.%20Vet.%20Josu%C3%A8%20Rodrigo%20Navarajo%20Garc%C3%ACa.pdf>

Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 110–117. Recuperado de: <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>

Vicente, A. (2017). Detección de *Ehrlichia canis* mediante PCR en tiempo final en muestras de sangre canina sospechosas provenientes de la zona Lima Norte. *Ehrlichiosis monocítica canina*. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/1374>

Wichianchot, S., Hongsrirachan, N., Maneeruttanarungroj, C., Pinlaor, S., Iamrod, K., Purisarn, A., Donthaisong, P., Karanis, P., Nimsuphan, B., & Rucksaken, R. (2022). A newly developed droplet digital PCR for *Ehrlichia canis* detection: comparisons to conventional PCR and blood smear techniques. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(6), 831–840. Recuperado de: <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0086>

Xia, Z., Johansson, M. L., Gao, Y., Zhang, L., Haffner, G. D., MacIsaac, H. J., & Zhan, A. (2018). Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. *Ecology and Evolution*, 8(23), 11799–11807. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/ece3.4636>

Zetina, M., Gallegos, J., & Rosado, K. (2019). Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Scielo*. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe conflicto de interés posible.

Financiamiento:

No existió asistencia financiera de partes externas al presente artículo.

Agradecimiento:

Al Ing. José Chica por la apertura al laboratorio de biología molecular de la Universidad Estatal de Cuenca, FCA.

Nota:

El artículo no es producto de una publicación anterior.