



Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), julio-agosto 2026,
Volumen 10, Número 4.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v10i4

TAMIZAJE MOLECULAR DE ANAPLASMATACEAE MEDIANTE PCR DIRIGIDA AL GEN 16S RRNA EN CANINOS SINTOMÁTICOS DE MACHALA, ECUADOR

**MOLECULAR SCREENING OF ANAPLASMATACEAE BY
16S RRNA GENE-TARGETED PCR IN SYMPTOMATIC DOGS
FROM MACHALA, ECUADOR**

Luis Antonio Bacusoy Gaibor
Universidad Técnica de Machala, Ecuador

Fernando L. Aguilar Gálvez
Universidad Técnica de Machala, Ecuador

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v10i4.25793

Tamizaje Molecular de Anaplasmataceae Mediante PCR Dirigida al Gen 16S rRNA en Caninos Sintomáticos de Machala, Ecuador

Luis Antonio Bacusoy Gaibor¹lbacusoy1@utmachala.edu.ec<https://orcid.org/0009-0000-0223-9822>

Universidad Técnica de Machala

Ecuador

Fernando L. Aguilar Gálvezflaguilar@utmachala.edu.ec

Universidad Técnica de Machala

Ecuador

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas representan un desafío diagnóstico en caninos debido a la similitud de sus manifestaciones clínicas y a la circulación de distintos agentes de la familia Anaplasmataceae. El objetivo de este estudio fue detectar ADN de Anaplasmataceae mediante PCR convencional dirigida al gen 16S rRNA en caninos sintomáticos de Machala, Ecuador. Se analizaron 30 muestras de sangre de perros con signos compatibles con enfermedades hemotrópicas transmitidas por vectores. El ADN total fue extraído de sangre entera y amplificado mediante los cebadores EHR16SD/EHR16SR, dirigidos a un fragmento de aproximadamente 345 pb del gen 16S rRNA. Once de las 30 muestras resultaron positivas, con una frecuencia de detección molecular del 36,7 % (IC 95 %: 21,9–54,5 %). No se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la positividad molecular y la edad, el sexo o la raza ($p > 0,05$). La PCR dirigida al 16S rRNA demostró utilidad como herramienta de tamizaje molecular para *Anaplasmataceae* en caninos sintomáticos; sin embargo, la identificación definitiva del género o especie requiere secuenciación o ensayos moleculares específicos.

Palabras clave: anaplasmataceae, PCR convencional, 16S rRNA, diagnóstico molecular, caninos

¹ Autor principal

Correspondencia: lbacusoy1@utmachala.edu.ec

Molecular Screening of Anaplasmataceae by 16S rRNA Gene-Targeted PCR in Symptomatic Dogs from Machala, Ecuador

ABSTRACT

Tick-borne diseases represent a diagnostic challenge in dogs because of the overlap in their clinical manifestations and the circulation of different members of the family *Anaplasmataceae*. This study aimed to detect *Anaplasmataceae* DNA by conventional PCR targeting the 16S rRNA gene in symptomatic dogs from Machala, Ecuador. Thirty blood samples were collected from dogs exhibiting clinical signs compatible with vector-borne hemotropic diseases. Total DNA was extracted from whole blood and amplified using the EHR16SD/EHR16SR primer pair, targeting an approximately 345-bp fragment of the 16S rRNA gene. Eleven of the 30 samples tested positive, corresponding to a molecular detection frequency of 36.7% (95% CI: 21.9–54.5%). No statistically significant associations were observed between molecular positivity and age, sex, or breed ($p > 0.05$). PCR targeting the 16S rRNA gene proved useful as a molecular screening tool for *Anaplasmataceae* in symptomatic dogs; however, definitive identification at the genus or species level requires sequencing or additional specific molecular assays.

Keywords: anaplasmataceae, conventional PCR, 16S rRNA, molecular diagnosis, dogs

*Artículo recibido 14 julio 2026
Aceptado para publicación: 21 agosto 2026*



INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son vectores de diversos agentes responsables de enfermedades transmitidas por vectores en perros, entre ellos bacterias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. *Ehrlichia canis* causa la ehrlichiosis monocítica canina, mientras que *Anaplasma platys* infecta las plaquetas y causa trombocitopenia cíclica canina (Jimenez y col., 2020). Cordeiro y col., (2023) y Jimenez y col., (2020) señalaron que la infección por *E. canis* puede manifestarse con letargia, inapetencia, fiebre y pérdida de peso, además de alteraciones hematológicas como anemia y trombocitopenia. Por su parte, la infección por *A. platys* puede presentar signos clínicos leves e inespecíficos, entre ellos letargia y linfadenopatía generalizada. Asimismo, Lara y col., (2020) indicaron que ambas infecciones pueden presentar manifestaciones clínicas amplias, inespecíficas y superpuestas, lo que representa una dificultad para su diferenciación clínica.

En Ecuador se han documentado resultados serológicos y moleculares que evidencian la presencia de estos agentes en poblaciones caninas. En Santa Cruz, Galápagos, Jimenez y col., (2020) evaluaron 58 perros y reportaron una seropositividad de 48,3 % para *E. canis*/*E. ewingii* y de 12,1 % para *A. phagocytophilum*/*A. platys*; mediante PCR, *E. canis* fue detectada en el 12,1 % de los animales estudiados. Más recientemente, Culda y col., (2025) y Vargas-Hernandez, y col., (2016) determinaron una prevalencia molecular de 20,3 % para *A. phagocytophilum*, mientras que *A. platys* fue identificada en el 2,9 % de las muestras. Estos antecedentes evidencian la detección de agentes de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* en poblaciones caninas de Ecuador mediante métodos serológicos y moleculares. Cerro y col., (2022) señalaron que cuando ambas infecciones están presentes en una misma población canina, el diagnóstico se hace aún más difícil, por lo que se necesitan métodos que permitan diferenciarlas. Dado que las infecciones tienen manifestaciones clínicas muy similares, no se puede identificar la causa mediante la evaluación clínica sola (Macedo, y col., 2022). Cabrera-Jaramillo y col., (2022) y Almazán y col., (2016) demostraron que la PCR permite detectar ADN bacteriano en muestras clínicas y, según los cebadores utilizados, orientar la amplificación hacia géneros o especies determinadas. Este enfoque ha sido empleado para la detección molecular de *Ehrlichia* y *Anaplasma* en perros y para la posterior identificación específica de los agentes amplificados. Abarca y col., (2007) utilizaron una primera amplificación dirigida a miembros de *Anaplasmataceae* y ensayos posteriores



con cebadores específicos para diferenciar especies, entre ellas *E. canis* y *A. platys*. La selección de cebadores y de la región genética diana determina, por tanto, el nivel taxonómico al que pueden interpretarse los productos obtenidos mediante PCR. Se ha documentado molecularmente la presencia de *E. canis* en pacientes caninos con signos clínicos compatibles con la ehrlichiosis monocítica canina en Machala (Correa-Vivanco y col., 2024; Alhassan, y otros, 2021). Sin embargo, para diferenciar *Ehrlichia* de *Anaplasma* en una población clínica homogénea se requieren técnicas que ayuden a diferenciar entre ambos géneros y que permitan identificar específicamente la presencia de *E. canis*. Por tanto, el objetivo de este estudio fue detectar ADN de bacterias de la familia Anaplasmataceae mediante PCR convencional dirigida al gen 16S rRNA en caninos sintomáticos con sospecha clínica de enfermedades transmitidas por garrapatas en Machala, Ecuador.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio y población

Se realizó un estudio descriptivo de detección molecular en 30 caninos atendidos en la ciudad de Machala, provincia de El Oro, Ecuador. Los animales correspondieron a diferentes edades, sexos y razas y fueron seleccionados por presentar signos clínicos compatibles con enfermedades hemotrópicas transmitidas por vectores. La información clínica y epidemiológica se registró mediante una ficha estandarizada que incluyó identificación del paciente, antecedentes clínicos, exposición a vectores y características del entorno.

Recolección y conservación de las muestras sanguíneas

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción de la vena cefálica utilizando material estéril. Se recolectaron aproximadamente 0,5–1,0 mL de sangre por animal y se transfirieron inmediatamente a tubos con EDTA, previamente identificados. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH) en un contenedor refrigerado con acumuladores de frío y se mantuvieron bajo refrigeración hasta su procesamiento molecular.



Extracción y cuantificación del ADN

El ADN total se extrajo a partir de 50 µL de sangre entera mediante el Quick-DNA™ Microprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA; Cat. No. D3021; lote 256484), utilizando columnas Zymo-Spin™ IC y siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las muestras se lisaron con 200 µL de Genomic Lysis Buffer; el lisado se transfirió a la columna de purificación y se centrifugó a $10\,000 \times g$ durante 1 min. La columna se lavó secuencialmente con 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer y 500 µL de g-DNA Wash Buffer. Finalmente, el ADN se eluyó en 10 µL de DNA Elution Buffer después de una incubación de 2–5 min a temperatura ambiente y se almacenó a $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La concentración del ADN extraído se determinó mediante un fluorómetro Quantus™ (Promega Corporation). Todas las muestras fueron trabajadas entre 50 a 200 ng de DNA total por corrida de PCR.

Detección molecular mediante PCR convencional

La detección molecular se realizó mediante PCR convencional dirigida a un fragmento de aproximadamente 345 pb del gen 16S rRNA de miembros de la familia Anaplasmataceae. Se utilizaron los cebadores EHR16SD (5'-GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC-3') y EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3'), previamente descritos para el tamizaje molecular de Anaplasmataceae (Inokuma y col., 2000). Cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µL, compuesto por 12,5 µL de PCR Master Mix 2× (abm, Canadá), 0,6 µL de cada cebador (10 pmol/µL), 8,3 µL de agua de grado molecular y 3,0 µL de ADN molde.

La amplificación se efectuó en un termociclador TECHNE Progene (Reino Unido) con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 34 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 90 s, y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Electroforesis y visualización de los productos de PCR

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) preparados en tampón TAE. Para cada muestra se cargaron 5 µL del producto de PCR y se incluyó un marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 100 V durante 15–20 min y los productos se visualizaron en un transiluminador. La presencia de una banda de aproximadamente 345 pb se consideró compatible con amplificación del blanco 16S rRNA esperado.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron muestras sanguíneas de 30 caninos atendidos en la ciudad de Machala, seleccionados por presentar signos clínicos compatibles con enfermedades hemotrópicas transmitidas por vectores. Mediante PCR convencional dirigida al gen 16S rRNA, 11 de las 30 muestras (36,7%; IC 95%: 21,9–54,5%) mostraron amplificación del fragmento esperado de aproximadamente 345 pb, mientras que 19 muestras (63,3%) no presentaron amplificación detectable.

Figura 1



Detección molecular de Anaplasmatidae dirigida al gen 16S rRNA. Los carriles M1–M8 corresponden a muestras clínicas; L, marcador de peso molecular; CP, control positivo; y CN, control negativo. La presencia de una banda de aproximadamente 345 pb se consideró compatible con amplificación del fragmento esperado del gen 16S rRNA de Anaplasmatidae (M3 y M8).

La detección de ADN compatible con miembros de la familia Anaplasmatidae demuestra la presencia de estos agentes en la población clínica evaluada y aporta evidencia molecular de su circulación en perros sintomáticos de Machala. Este hallazgo es consistente con investigaciones previas realizadas en el sur del Ecuador. Vázquez Borja y col., (2024), en un estudio desarrollado en el cantón Ponce Enríquez con participación de Aguilar Gálvez, detectaron mediante PCR *Ehrlichia canis* en 14 de 45 perros previamente positivos por inmunocromatografía. En Santa Cruz, Galápagos, Jimenez y col., (2020) analizaron 58 perros y detectaron mediante PCR *E. canis* en el 12,1 % de los animales, además de documentar seropositividad para *E. canis*/*E. ewingii* y *A. phagocytophilum*/*A. platys*. Por otra parte, Culda y col., (2025), mediante el análisis molecular de 1.221 perros procedentes de cuatro islas de Galápagos, reportaron una prevalencia molecular de 20,3 % para *A. phagocytophilum* y detectaron *A. platys* en el 2,9 % de las muestras.

No obstante, las frecuencias de detección en estos estudios no son directamente comparables, debido a que en aquel trabajo los animales fueron preseleccionados mediante una prueba serológica, mientras que en el presente estudio la inclusión se basó exclusivamente en la presencia de signos clínicos compatibles con enfermedades transmitidas por vectores.

Asimismo, Chalco-Torres y col., documentaron molecularmente una coinfección por *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii* en un perro en Ecuador, lo que evidencia que diferentes miembros de Anaplasmataceae pueden circular en el contexto regional. De manera complementaria, Cañar-Romero y col., detectaron ADN de *Ehrlichia canis* en 18 de 34 perros seropositivos evaluados mediante PCR convencional.

En conjunto, estos antecedentes respaldan la utilidad de las herramientas moleculares para investigar infecciones transmitidas por garrapatas en poblaciones caninas del país, aunque las diferencias en criterios de selección, blancos moleculares y pruebas diagnósticas limitan la comparación directa de las frecuencias reportadas.

Debe considerarse que el par de cebadores EHR16SD/EHR16SR reconoce una región conservada del gen 16S rRNA en diferentes miembros de Anaplasmataceae. En consecuencia, las 11 muestras positivas deben interpretarse como detección molecular a nivel de familia y no como identificación definitiva de *Anaplasma* spp. o *Ehrlichia* spp. La asignación taxonómica a nivel de género o especie requiere la secuenciación de los amplicones o la aplicación de ensayos moleculares adicionales con mayor especificidad.

No se identificaron asociaciones estadísticamente significativas entre la detección molecular de Anaplasmataceae y las variables edad, sexo o raza ($p > 0,05$). Este patrón coincide con lo descrito por Vázquez Borja y col., para perros evaluados por *Ehrlichia canis* en Ponce Enríquez, donde tampoco se observaron asociaciones significativas con estas variables. Sin embargo, la ausencia de significancia estadística no debe interpretarse como evidencia de ausencia de efecto biológico. El tamaño muestral del presente estudio ($n = 30$), junto con la selección clínica de los animales y la posible distribución desigual entre categorías, limita la potencia estadística para detectar asociaciones de magnitud moderada.



La exposición a bacterias de la familia Anaplasmataceae depende además de factores relacionados con la ecología del vector y el manejo animal, entre ellos la infestación por garrapatas, el uso de ectoparasiticidas, las condiciones de alojamiento, el historial de exposición y la circulación local de los agentes. Estas variables podrían explicar mejor la heterogeneidad de la detección que características individuales como sexo, edad o raza y deberían incorporarse en estudios posteriores con mayor tamaño muestral. Finalmente, los signos clínicos asociados con enfermedades transmitidas por garrapatas son inespecíficos y pueden solaparse entre diferentes agentes etiológicos. Por ello, la selección de perros sintomáticos incrementa la sospecha clínica, pero no permite establecer por sí sola la etiología. Los resultados obtenidos respaldan el uso de la PCR dirigida al 16S rRNA como herramienta de tamizaje molecular; sin embargo, la caracterización de los amplicones positivos será necesaria para determinar los géneros y especies de *Anaplasmataceae* circulantes en los caninos de Machala.

CONCLUSIONES

La PCR convencional dirigida al gen 16S rRNA detectó ADN de *Anaplasmataceae* en 11 de 30 caninos sintomáticos (36,7%) de Machala, Ecuador. No se observaron asociaciones significativas entre la detección molecular y la edad, el sexo o la raza de los animales ($p > 0,05$). El empleo de un blanco conservado permite una detección amplia de miembros de Anaplasmataceae, lo que representa una ventaja como estrategia inicial de diagnóstico molecular en la práctica clínica veterinaria. Sin embargo, la identificación definitiva a nivel de género o especie requiere complementar el tamizaje con secuenciación o ensayos moleculares específicos. Este enfoque puede contribuir a fortalecer el diagnóstico etiológico y la vigilancia de agentes transmitidos por vectores en caninos de la región.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abarca, K., López, J., Perret, C., Guerrero, J., Godoy, P., Veloz, A., . . . Azócar, T. (2007). *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, 1392–1395. doi:10.3201/eid1309.070021
- Alhassan, A., Hove, P., Sharma, B., Matthew-Belmar, V., Karasek, I., Lanza-Perea, M., . . . Ganta, R. (2021). Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the Caribbean. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4. doi:10.1016/j.ttbdis.2021.101727



- Almazán, C., González-Álvarez, V., Fernández de Mera, I., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 276-283.
doi:10.1016/j.ttbdis.2015.11.002
- Araújo, B., Bezerra, I., Leite, G., Haisi, A., Araújo, J., Souza, F., . . . Braga, J. (2025). Single and co-infections by *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, and *Hepatozoon canis* in dogs from Rio Grande do Norte, Brazil: Frequency and molecular characterization. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária / Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 14.
doi:10.1590/S1984-29612025067
- Cabrera-Jaramillo, A., Monsalve, S., Arroyave, E., & Rodas, J.-D. (2022). Prevalencia de *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis* en perros de albergues en el sur del Valle de Aburrá, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 82-92. doi:10.17533/udea.rccp.v35n2a01
- Cañar, P., Vallecillo, A., & Castillo, E. (2023). Detección de material genético mediante reacción en cadena de polimerasa en muestras de caninos seropositivos a *Ehrlichia canis*. *MQRInvestigar*, 1188–1200. doi:10.56048/MQR20225.7.2.2023.1188-1200
- Cerro, L., Cordeiro, M., Seabra-Junior, E., Emmerick, S., & Pereira, N. (2022). Molecular detection of Anaplasmataceae agents on dogs from the Department of Piura, Peru. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*, 134-144. doi:10.5216/rpt.v51i2.71516
- Cordeiro, M., Gaudêncio, F., Jônathan, C., Nathalie, C., Fonseca, A., & Baêta, B. (2023). Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia* spp. in dogs served at a clinic in the metropolitan region of the state of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 29–34. doi:10.4322/rbcv.2023.0005
- Correa-Vivanco, S., Guerrero-López, A., Chalco-Torres, L., Sánchez, R., & Nirchio-Tursellino, M. (2024). Estudio molecular de Ehrlichiosis monocítica canina en la ciudad de Machala, Ecuador. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 6. doi:10.52973/rcfcv-e34378
- Culda, C., Panait, L., Cazan, C., Sprong, H., Vinueza, R., Páez-Rosas, D., . . . Mihalca, A. (2025). First report of *Anaplasma phagocytophilum* in Galapagos: High prevalence in dogs and

- circumstantial evidence for the role of *Rhipicephalus linnaei* as vector. *Transboundary and Emerging Diseases*, 13. doi:10.1155/tbed/5542334
- Jimenez, I., Vega, P., Stapleton, G., Battista, J., & Bowman, D. (2020). Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9. doi:10.1016/j.vprsr.2020.100373
- Lara, B., Conan, A., Thrall, M., Ketzis, J., Carmichael, G., & Rajeev, S. (2020). Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. *Pathogens*, 488. doi:10.3390/pathogens9060488
- Macedo, L., Bezerra-Santos, M., Ubirajara Filho, C., Sales, K., Sousa-Paula, L., Silva, L., . . . Otranto, D. (2022). Vector-borne pathogens of zoonotic concern in dogs from a Quilombola community in northeastern Brazil. *Parasitology Research*, 3305–3311. doi:10.1007/s00436-022-07661-x
- Vargas-Hernandez, G., André, M., Cendales, D., Sousa, K., Gonçalves, L., Rondelli, M., . . . Tinucci-Costa, M. (2016). Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 459–464. doi:10.1590/S1984-29612016066
- Vásquez, S., Aguilar, F., Guerrero, A., Mocha, B., Baylón, M., & Sánchez, R. (2024). Detección molecular con la técnica de PCR en un solo paso para *Ehrlichia canis* en perros del cantón Ponce Enríquez, Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8018. doi:10.37811/cl_rcm.v8i2.11234

