



*Universidad Nacional
"Pedro Ruiz Gallo"*



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
LAMBAYEQUE-PERU**

**"DETERMINACIÓN DE EHRlichiosis
CANINA EN LA CIUDAD DE CHICLAYO,
MEDIANTE DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y
HEMATOLÓGICO DIRECTO DURANTE
ENERO - OCTUBRE 2014"**

TESIS

Presentada para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

POR

JESÚS MIGUEL OLIVA GUZMÁN

*Lambayeque - Perú
2015*



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
LAMBAYEQUE-PERU



**“DETERMINACION DE EHRLICHIOSIS
CANINA EN LA CIUDAD DE CHICLAYO,
MEDIANTE DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y
HEMATOLÓGICO DIRECTO DURANTE ENERO
– OCTUBRE 2014”**

TESIS

Presentada para obtener el Título Profesional de:

MEDICO VETERINARIO

POR

JESÚS MIGUEL OLIVA GUZMÁN

LAMBAYEQUE

PERU

2015

**“DETERMINACION DE EHRLICHIOSIS CANINA EN
LA CIUDAD DE CHICLAYO, MEDIANTE
DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y HEMATOLÓGICO
DIRECTO DURANTE ENERO – OCTUBRE 2014”**


TESIS PRESENTADA PARA OBTAR EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO

POR

Bach. JESUS MIGUEL OLIVA GUZMÁN

APROBADO POR


M.V. MSc JOSE LUIS VILCHEZ MUÑOZ
PRESIDENTE


M.V. SEGUNDO MONTENEGRO VIDARTE
SECRETARIO


M.V. ZULLY MONTENEGRO ESQUIVEL
VOCAL


M.V. MSc. RUTH ALVA FERNANDEZ
PATROCINADOR

DEDICATORIA

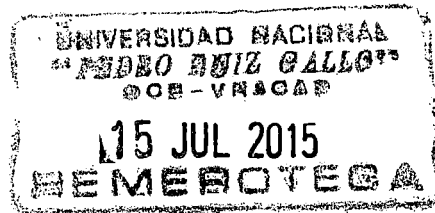
A Dios por dejarme realizar este trabajo y poner a las personas necesarias para que todo salga de la manera correcta.

A mis padres por siempre apoyarme en mis decisiones y en la realización de este trabajo que con amor y paciencia me animaban a seguir cuando lo estaba por abandonar, muchas gracias viejitos lindos.

A mi amor Ytalia que se amanecía a la distancia conmigo cuando realizaba las observaciones microscópicas, gracias amorcito.

Al Dr. Cesar Bravo mi maestro y amigo por muchos años.

A un gran doctor y ahora amigo el Dr. Luis Antonio Hoyos Sifuentes de la UNMSM quien fue el que me ayudo desde Lima a entender y completar toda mi información y llegar a todas las respuestas para este trabajo.



INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	12
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	15
2.1.	Características del agente patógeno	15
2.2.	Enfermedades ehrlichiales en caninos	24
2.3.	Ehrlichiosis humana	25
2.4.	Transmisión por garrapatas de las Ehrlichiosis humana y canina	26
2.5.	Patogénesis de la Ehrlichiosis canina por <i>Ehrlichia canis</i>	31
2.6.	Cuadro clínico	33
2.7.	Alteraciones laboratoriales en el curso de la Ehrlichiosis canina	34
2.8.	Diagnóstico de la Ehrlichiosis canina	37
III.	MATERIAL Y METODOS	
3.1.	Localización	40
3.2.	Material biológico y equipo	40
3.3.	Metodología	41
3.4.	Análisis de los datos	46
IV.	RESULTADOS	
4.1.	De los hallazgos clínicos	47
4.2.	De los resultados hematológicos	49
4.3.	Otras variables en estudio	57
4.4.	Porcentajes en células infectadas	65
V.	DISCUSIÓN	67
VI.	CONCLUSIONES	73
VII.	RECOMENDACIONES	74
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75
IX.	APENDICES	82

INDICE INDICE DE CUADROS

CUADRO 1: RELACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS COMPATIBLES CON EHRLICHIOSIS CANINA Y LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MÓRULAS (omm) DE <i>E. Canis</i> .	47
CUADRO 2: ANALISIS DE LAS CITOPENIAS ENCONTRADAS EN LOS 66 CASOS COMPATIBLES CON EHRLICHIOSIS CANINA FRENTE A LA OBSERVACIÓN DE MORULAS DE <i>E. Canis</i>	49
CUADRO 3: RELACION ENTRE TROMBOCITOPENIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. Canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	51
CUADRO 4: RELACION ENTRE LEUCOPENIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. Canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	53
CUADRO 5: RELACION ENTRE ANEMIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. Canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	55
CUADRO 6: RELACION ENTRE ANRECEDENTES DE GARRAPATAS Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. Canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	57
CUADRO 7: RELACION ENTRE LA VARIABLE SEXO Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. Canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	59
CUADRO 8: RELACION ENTRE LA VARIABLE EDAD Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. Canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	61

CUADRO 9: RELACION ENTRE LA VARIABLE RAZA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. Canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO	63
--	-----------

CUADRO 10: PORCENTAJES DE CÉLULAS INFECTADAS POR MURULAS DE EHRLICHIA SPP.	65
---	-----------

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: MICROSCOPIO PARA LA OBSERVACION DE MORULAS INTRACITOPLAMATICA DE EHRlichia	43
FIGURA 2: INCLUSIONES CITOPLASMICAS COMPATIBLES CON <i>E. canis</i>	44
FIGURA 3: MORULA DE EHRlichia spp EN NEUTROFILO	44
FIGURA 4: MORULA EN LINFOCITO	45
FIGURA 5: RELACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS COMPATIBLES CON EHRlichiosis CANINA Y LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MÓRULAS DE <i>E. canis</i> .	48
FIGURA 6: ANALISIS DE LAS CITOPENIAS ENCONTRADAS EN LOS 66 CASOS COMPATIBLES CON EHRlichiosis CANINA FRENTE A LA OBSERVACIÓN DE MORULAS DE <i>E. canis</i>	50
FIGURA 7: RELACION ENTRE TROMBOCITOPENIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE <i>E. canis</i> DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.	52

FIGURA 8:

RELACION ENTRE LEUCOPENIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO. 54

FIGURA 9:

RELACION ENTRE ANEMIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO 56

FIGURA 10:

RELACION ENTRE ANRECEDENTES DE GARRAPATAS Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO 58

FIGURA 11:

RELACION ENTRE LA VARIABLE SEXO Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO. 60

FIGURA 12:

RELACION ENTRE LA VARIABLE EDAD Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO 62

FIGURA 13:

RELACION ENTRE LA VARIABLE RAZA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE E. canis DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO 64

FIGURA 14:

PORCENTAJES DE CÉLULAS INFECTADAS POR MURULAS DE EHRLICHIA SPP 66

LISTA DE APENDICES

APENDICE 1:

DATOS BASICOS DE TODOS LOS CANINOS EN ESTUDIO Y CELULA
INFECTADAS EN LOS CANINOS POSITIVOS A OBSERVACION 82
MICROSCOPICA DE MÓRULAS COMPATIBLES A EHRlichia spp

APENDICE 2:

RESULTADOS DEL HEMOGRAMA DE LOS CANINOS EN ESTUDIO 84

APENDICE 3:

GARRAPATA *Amblyoma maculatum* ENCONTRADA EN UN CANINO CON 86
EHRlichiosis CANINA

APENDICE 4:

CUADRO CLINICO EHRlichiosis CANINA 87

APENDICE 5:

HISTORIA CLÍNICA 89

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de tener un diagnóstico más certero en la Ehrlichiosis canina, mediante un estudio de los síntomas y el hemograma sanguíneo corroborando esto con la presencia de mórulas de Ehrlichia canis en los frotis de los animales sospechosos, se estudiaron 66 animales sospechosos tomando muestras de sangre periférica de punta de oreja para los frotis sanguíneos y de la vena cefálica para el hemograma y mediante las pruebas estadísticas necesarias se determinó la relación que existe entre estas pruebas diagnósticas.

Palabras claves: Ehrlichia canis, hemograma, frotis sanguíneo, trombocitopenia, anemia, mórulas.

ABSTRACT

This work we did in order to have a more accurate diagnosis in canine Ehrlichiosis, through a study of the symptoms and blood CBC corroborating this with the presence of morula of *Ehrlichia canis* in smears of suspect animals were studied 66 animals suspected peripheral blood sampling from ear tip to the blood smear and the cephalic vein for blood count and statistical tests required by the relationship between these diagnostic tests were determined.

Keywords: *Ehrlichia canis*, blood count, blood smear, thrombocytopenia, anemia, morula.

I.- INTRODUCCIÓN

El pasar del tiempo y la introducción de enfermedades emergentes y con sintomatología variable como es la Ehrlichiosis canina está haciendo que múltiples investigadores deseen encontrar la forma de controlar eficientemente estas enfermedades.

La Ehrlichiosis canina fue identificada en nuestro país en el año 1982 luego de la importación de perros de raza Pastor Alemán desde EE.UU. para la Policía Nacional (Chavesta et al. 1982), desde entonces esta enfermedad tiene cada vez mayor impacto en nuestro medio y cobra cada vez más vidas caninas.

La Ehrlichiosis canina tiene como causante principal en nuestro medio a *Ehrlichia canis* y cuyo vector es la garrapata parda del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Mc Bride et al. 2001). Existen otras especies ehrlichiales que producen la enfermedad y que recientemente están siendo estudiadas y descubiertas en nuestro país tal es el caso de *E. chaffeensis* y/o *E. ewingii* reportadas en el distrito de La Molina en Lima después de reportarse un canino con ehrlichiosis granulocítica canina (EGC), las cuales son patógenos en humanos; *E. chaffeensis* se observó también con una seropositividad del 20% en personas que trabajaban con animales (Paulino, 2011).

De manera clínica la enfermedad tiene una amplia variedad de síntomas cursando por diferentes etapas iniciando una fase aguda con síntomas inespecíficos como palidez de mucosas, fiebre, anorexia, depresión, esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenomegalia (Parnell 2004), seguida de una etapa subclínica sin sintomatología aparente para finalmente llegar a una etapa crónica caracterizada por una postración marcada, poliartritis, pérdida progresiva de peso, marcada palidez de mucosas, petequias, equimosis y epistaxis (Neer, 200) con aplasia medular, hemorragias internas y finalmente la muerte.

En la práctica la hematología es una herramienta diagnóstica que debería ser siempre una buena guía, por esto el presente trabajo de investigación busca relacionar los resultados de un hemograma completo (Hb, Htco, PLAQUETAS, GR, GB y diferencial) con el método diagnóstico directo de la observación microscópica de mórula de *Ehrlichia spp.*

Hematológicamente, en la fase aguda se observa trombocitopenia, anemia y leucopenia en intensidad de leve a moderada (Botelho de castro et al. 2004) pudiendo encontrarse también una leucocitosis con monocitosis y/o linfocitosis. En la etapa subclínica persisten las alteraciones principalmente la trombocitopenia (Ettinger, 1992). Finalmente alteraciones severas como trombocitopenia, anemia y leucocitosis marcadas provocados por una aplasia medular, caracterizan la fase crónica (Harrus et al. 1999).

Existen además complementos diagnósticos en la hematología como son los perfiles renal y hepático en los cuales nos proporcionan indicadores de esta enfermedad como son la hiperproteinemia caracterizada por hiperglobulinemia (beta y gammaglobulinas) y la hipoalbuminemia, que son las alteraciones bioquímicas más resaltantes de la Ehrlichiosis canina (Harrus et al, 1997). En el uroanálisis los hallazgos más frecuentes son proteinuria, hematuria y bilirrubinuria.

Técnicas diagnósticas más avanzadas son las serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFA), la inmunoelectrotransferencia (EITB) y la técnica inmunoabsorbente ligada a enzima (ELISA) esta última ya está disponible en el mercado como kits de ELISA los cuales son fáciles y rápidas de usar pero dado a su elevado valor económico no son accesibles a todos los propietarios preocupados por una pronta recuperación de su canino, por lo que el hemograma sigue siendo una herramienta confiable y económica.

Actualmente con la utilización de las nuevas técnicas a nivel molecular está revolucionando el diagnóstico de la enfermedad, llegando a conocer los genes involucrados en la expresión

de antígenos inmunodominantes de los microorganismos ehrlichiales (McBride et al. 2003) así como la expresión de estos genes en los hospederos naturales (vertebrados e invertebrados) dentro del ciclo biológico de la bacteria (Unver et al. 2001). La inmunización eficiente es la nueva tarea de los investigadores, de tal forma que los genes que codifican proteínas de importancia diagnóstica, están siendo utilizados en el laboratorio, insertándolos en microorganismos que a su vez expresan las proteínas en altas cantidades. Estas proteínas recombinantes son la base para la inducción de una inmunización dirigida y específica contra las proteínas que promueven la respuesta inmune en los animales infectados (Felek et al. 2003).

De tal modo, que al observar microscópicamente la mórula de *Ehrlichia* corroboramos que la sintomatología conjuntamente con la hematología son técnicas diagnósticas efectivas de la enfermedad.

De las diversas formas de diagnóstico, el diagnóstico clínico y el hematológico son técnicas efectivas y de bajo costo por lo que su utilidad está al alcance de la mayoría de propietarios, de manera que serán una herramienta valiosa para el médico tratante.

Es por eso que en presente trabajo se ha investigado la ehrlichiosis canina en la ciudad de Chiclayo, mediante diagnóstico clínico y hematológico directo.

II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1. CARACTERISTICAS DEL AGENTE PATOGENO

Desde hace muchos años existía la controversia acerca de la clasificación correcta de la clasificación correcta de los microorganismos rickettsiales, siendo colocados como un grupo intermedio entre las bacterias y los virus. Actualmente este concepto a cambiado y son considerados como bacterias, debido a la similitud genética con ellas (Carter, 1985).

2.1.1. GENERALIDADES DE LOS AGENTES RICKETTSIALES

Los microorganismos rickettsiales pertenecen al Reino *Proteobacteria*, clasificados como alfa – proteobacterias gram negativas, grupo que incluye un gran número de agentes oligotrofos (capaces de crecer en niveles bajos de nutrientes). Dentro de este Reino se encuentran también los géneros *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, y *Vibrio*. Esta clasificación ha sido tomada del Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey, que actualmente se encuentra en su novena edición, el cual ordena a los microorganismos basándose en las secuencias de oligonucleótidos firma del gen ARNr 16s (Prescott et al., 1999).

Estos microorganismos se presentan en formas bacilares, cocoides o pleomórficas, presentándose paredes típicas de bacterias gram negativas con ausencia de flagelos (Prescott et al., 1999). Las formas bacilares son cortas, mientras que las cocoides se presentan aisladas, en pares, cadenas cortas o en filamentos (Brookset al., 1999). Estas bacterias tienden a ser muy pequeñas, teniendo un diámetro de 0.3 a 0.5 μm y una longitud de 0.8 a 2.0 μm (Prescott et al., 1999). Estos agentes teñidos son fáciles de visualizar con el microscopio de luz. Con la tinción de Giemsa muestran color azul, con la de Macchiavello color rojo en contraste con el citoplasma teñido de azul que las rodea (Brooks et al., 1999; Carter, 1985).

Todos los microorganismos *Rickettsiales* son parásitos o mutualistas. Las formas parásitas crecen en diversos tipos celulares (eritrocitos de vertebrados, células retículo-endoteliales y células del endotelio vascular), habitando a menudo en artrópodos que se alimentan de sangre, como pulgas, garrapatas, ácaros o piojos, que actúan como vectores o como huéspedes primarios (Prescott et al., 1999).

Una amplia variedad de animales son susceptibles a la infección de agentes rickettsiales. Éstas crecen fácilmente en el saco vitelino del embrión de pollo (la suspensión de saco vitelino contiene 10^9 partículas rickettsiales por ml). Se pueden obtener preparaciones puras mediante centrifugación diferencial de las suspensiones del saco vitelino. Muchas especies de rickettsias crecen en cultivos celulares y por razones de bioseguridad, solo deben aislarse en laboratorios de referencia (Brooks et al., 1999).

Los agentes rickettsiales pierden su actividad biológica cuando se almacenan a 0°C o se incuban por unas pocas horas a 36 °C. Estas crecen en diferentes partes de la célula (citoplasma o núcleo). Se ha sugerido que las rickettsias crecen mejor cuando el metabolismo de las células huésped es bajo. En general, son rápidamente destruidas por el calor, desecación y sustancias químicas bactericidas (Brooks et al., 1999).

2.1.2. . PROPIEDADES DEL GENERO EHRLICHIA SPP.

Los microorganismos del género *Ehrlichia spp* son pequeños, de forma cocoide o pleomórfica (Popov et al., 1998) y toman un color azul oscuro o púrpura con las tinciones de tipo Romanowsky (coloración Wright). Las bacterias son encontradas en vacuolas (fagosomas) en el citoplasma de células eucariotas "blanco o diana", principalmente leucocitos, quienes inhiben la fusión del fagosoma con los lisosomas (Sainz et al., 2000). Estas bacterias poseen muchos ribosomas y una fina red de hebras de ADN, además

existen agrupaciones ribosomales en el citoplasma de la célula infectada, cerca de la membrana citoplásmica de la vacuola (Rikihisa, 1996).

Estos microorganismos son aeróbicos y no crecen en medios bacteriológicos estándar, infectando células del sistema monocito-macrófago, granulocitos o plaquetas de seres humanos y de varias especies animales domésticas y silvestres (Vadillo et al., 2002). Se reproducen por fisión binaria al igual que la mayoría de las bacterias (Sainz et al., 2000). Las ehrlichias se producen en laboratorios utilizando líneas de cultivos celulares y dentro de las más comunes están las monocapas del pulmón de embrión de humano (HEL), fibroblastos (HEL 299), células renales de mono (verde V ero) y algunas líneas de carcinoma (HeLa) (Brouqui et al., 1994). Estos microorganismos carecen de la ruta glucolítica y no utilizan glucosa como fuente de energía, sino que oxidan glutamato y productos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como el succinato. Presentan un sistema de transporte mediado por transportador, de tal forma que los nutrientes y las coenzimas de la célula huésped se absorben y se utilizan de forma directa. Estos microorganismos captan NAD y uridina glucosa difosfato, así como también realizan intercambio de ADP por ATP de la célula hospedero, de tal forma que la célula puede aportar gran parte de la energía necesaria para el crecimiento intracelular de las ehrlichias (Prescott et al., 1999). La actividad metabólica de las ehrlichias es sensible a pH ácido (Dumler et al., 2001).

Una de las características patogénicas más significativas de los miembros de este género es la selección de células de la serie mielocítica como células diana. Estas especies muestran una cierta especificidad hacia el hospedero, existiendo evidencia de infecciones en hospederos no habituales (Vadillo et al., 2002).

Dentro del ciclo biológico general de las especies ehrlichiales se pueden distinguir dos formas típicas dentro del fagosoma. Los *cuerpos elementales* (CE), que tienen un diámetro

de 0.5 – 0.9 μm se dividen por fisión binaria para dar lugar a los *cuerpos reticulares* (CR) de 1.5 – 2.5 μm los cuales son similares a los cuerpos vistos en el género *Chlamidia spp* (Popov et al., 1998), estos a su vez se dividen produciendo las típicas mórulas (formadas incluso por más de 40 cuerpos elementales) que pueden llegar a tener un tamaño de 4 – 5 μm (Sainz et al., 2000).

Rikihisa, (1996) clasificó las formaciones o inclusiones ehrlichiales de la siguiente forma:

- . Inclusiones pequeñas (0.2-0.4 μm) : Denominadas también “formas densas” similares a los cuerpos elementales (CE) clamidiales.
- . Inclusiones relativamente largas (0.8 – 1.5 μm): Denominados también “formas ligeras”, similares a los cuerpos reticulares (CR) que son observados en especies muy patógenas del género *Ehrlichia spp*.

Sin embargo, el ciclo de vida de las ehrlichias que es similar al del género *Chlamidia spp*, no ha sido completamente demostrado. Éstas, están revestidas por una delgada membrana externa y otra membrana interna. Diferentes miembros del género *Rickettsia spp* y miembros del género *Ehrlichia spp* presentan muy delgada la membrana externa (Rikihisa, 1996).

Morfológicamente, los miembros del género *Ehrlichia spp* aparentemente no contienen cantidades significativas de peptidoglicano (Rikihisa, 1996). La ausencia del peptidoglicano puede deberse a diferencias entre las asociaciones covalentes y no covalentes de las proteínas de la membrana externa (Popov et al., 1998).

Las proteínas Thio-Disulfuro Oxidoreductasas son proteínas a fines a puentes disulfuro y han sido determinadas recientemente en *E. chaffensis* y *E. canis*. Estas proteínas son consideradas como factores importantes en el ciclo de vida y patogénesis de la enfermedad,

ya que cumplen un papel vital en el transporte intramolecular hacia el interior de los cuerpos ehrlichiales (McBride et al., 2002). Estas mismas proteínas han sido observadas en *Anaplasma marginale* (Vidotto et al., 1994) y especies del género *Chlamidia spp* Hatch et al., 1984).

El tamaño del genoma de las especies del género *Ehrlichia spp* es relativamente pequeño, aproximadamente de 1 Mb. Por ejemplo el genoma de *Anaplasma phagocytophilum* tiene 1.5 Mb; *E. chaffensis* 1.2 Mb y *E. sennetsu* 0.9 Mb, siendo determinados por técnicas electroforéticas (Dumler et al., 2001).

Las diferencias en la estructura de las mórulas de estas bacterias y sus interrelaciones con la "célula blanco", así como el estudio de las secuencias de bases del ARNr 16S, permitieron la posterior clasificación por genogrupos (Vadillo et al., 2002).

2.1.3. RECLASIFICACION DEL ORDEN RICKETTSIALES

El Orden *Rickettsiales* es un orden dividido que contiene tres familias: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* y *Anaplasmataceae* y muchos géneros patógenos que infectan diversas especies de vertebrados (Greene, 1997).

Las especies del género *Ehrlichia spp* se incluían dentro de la Familia *Rickettsiaceae* y se clasificaban principalmente por sus células blancas, es decir, se tenían cepas monocitotrópicas, granulocitotrópicas y trombocitotrópicas. Además se sabía que algunas especies tenían más de una célula blanco, tales como *E. chaffensis*, *E. risticii* y *E. phagocytophilum* (Neer, 2000).

Neer (2000), clasifico las especies ehrlichiales de la siguiente manera, dependiendo de la "célula blanco o diana":

MONOCITOTRÓPICAS

- ***Ehrlichia canis***: Afecta naturalmente a caninos e infecta células mononucleares y linfocitos.
- ***Ehrlichia chaffensis***: Afecta naturalmente a humanos, perros y venados e infecta células mononucleares, neutrófilos y linfocitos.
- ***Ehrlichia sennetsu***: Afecta naturalmente a humanos e infectan células mononucleares.
- ***Ehrlichia risticii***: Afecta naturalmente a caballos e infecta células mononucleares, células cebadas y enterocitos.
- ***Ehrlichia bovis***: Afecta naturalmente a los bovinos e infecta monocitos y macrófagos.

GRANULOCITOTRÓPICAS

- ***Ehrlichia ewingii***: Afecta naturalmente a perros e infecta neutrófilos y eosinófilos.
- ***Ehrlichia equi***: Afecta naturalmente a caballos, perros, humanos y llamas e infecta neutrófilos y eosinófilos.
- **Agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (AEGH)**: Afecta principalmente humanos, caballos y perros e infecta neutrófilos.
- ***Ehrlichia phagocytophila***: Afecta principalmente ovejas, bovinos y visones e infecta a neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

TROMBOCITOTRÓPICAS

- ***Ehrlichia platys***: Afecta naturalmente a perros e infecta únicamente plaquetas.

OTROS

- ***Cowdria ruminantium***: Afecta naturalmente a los bovinos e infecta células endoteliales, macrófagos y neutrófilos.

El género *Ehrlichia* spp a inicios de la década de los 90 empezó a sufrir múltiples cambios en la clasificación de las especies, teniendo como base 3 grupos; el primero formado por *E. canis*, *E. chaffensis* y *E. ewingii*. El segundo por *E. equi* y *E. phagocytophilum* y el tercer grupo formado por *E. risticii* y *E. sennetsu*. Aún no se clasificaba plenamente la *Ehrlichia platys* en algún grupo mencionado anteriormente. Esta clasificación se fue dando por las reacciones cruzadas a nivel serológico entre las especies (Greene, 1997).

Las enfermedades ehrlichiales que se dividen en un principio por la célula blanco, actualmente se clasifican por genogrupos, construyéndose un árbol filogenético (Parnell, 2004). Se ha incorporado información acerca de la biología molecular de las especies ehrlichiales que antes se desconocía. Inclusive, algunas especies del género *Ehrlichia* spp, incluyendo algunas que parasitan canes, fueron transferidos para el género *Anaplasma* spp (De Morris et al., 2004).

El gen ribosomal ARNr 16S de algunas especies comunes del género *Ehrlichia* spp fue secuenciado. Debido a la homología en la secuencia de los genes, las ehrlichias son relativamente idénticas al género *Rickettsia* spp (Dumler et al., 2001). El análisis de este gen determinó que el género *Rickettsia* spp con los géneros *Ehrlichia* spp, *Cowdria* spp, *Anaplasma* spp y *Wolbachia* spp son similares en un 84%. En el género *Ehrlichia* spp existen diferencias entre especies del mismo género, así como con el género *Rickettsia* spp (Dumler et al., 2001). La secuencia de estos genes determinó que la familia *Anaplasmataceae* está dividido en 4 géneros agrupados en 3 distintos grupos genéticos (genogrupos), con cerca de 7-15% de secuencias diferentes entre cada grupo (Dumler et

al., 2001), clasificando los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Popov et al., 1998).

Los genogrupos actualmente están conformados de la siguiente manera según la publicación hecha por Dumler et al., 2001:

El Genogrupo 1: ha sido renombrado como género *Ehrlichia* y está constituido por *E. canis*, *E. chaffensis*, *E. muris*, *E. ewingii* y *E. ruminantium* (Dumler et al., 2001). Estas especies forman grandes mórulas con muchas bacterias, a menudo suspendidas sobre una matriz fibrilar, encontrándose las mitocondrias y el retículo endoplasmático de la célula infectada en agregados muy cercanos a la mórula, incluso en contacto con su membrana (Vadillo et al., 2002).

El Genogrupo 2: ha sido renombrado como el género *Anaplasma*, el cual está constituido por *E. equi*, *E. phagocytophilum*, agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (AEGH) y *E. platys* (Yu et al., 2001). *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) también entra en este grupo, siendo 97% similar a las especies de este genogrupo (Dumler et al., 2001). Este género presenta mórulas no fibrilares y las mitocondrias así como el retículo endoplasmático no contactan con la membrana de la mórula (Vadillo et al., 2002).

La diferencia entre la *E. equi*, *E. phagocytophilum* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) es como máximo de 3 nucleótidos, por lo tanto se determinó que eran una misma especie (Dumler et al., 2001).

En el Genogrupo 3 están *E. sennetsu*, *E. risticii* el agente de *Stellantchasmus falcatus* (Agente SF) aislado del gusano *S. falcatus* (parásito de peces) en Japón y *Neorickettsia helminthoeca*. Este Genogrupo ha sido renombrado como género *Neorickettsia* (Dumler et al., 2001). Estas especies se desarrollan en pequeñas vacuolas individuales que no se

funden unas con otras, dividiéndose junto con los organismos ehrlichiales (Vadillo et al., 2002).

Los miembros del género *Wolbachia spp* y simbioses severos de insectos conforman un probable cuarto Genogrupo. Actualmente se desconoce si estas especies causan enfermedad en vertebrados (Dumler et al., 2001).

De acuerdo con la comparación de la secuencia del gen ARNr 16S, el género *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* de la Familia *Anaplasmataceae*, no están relacionados con el Orden *Rickettsiales* y han sido reclasificadas dentro del género *Mycoplasma spp* (Dumler et al., 2001).

El nuevo Genogrupo de *Ehrlichia*, excepto por *E. ewingii*, y *E. ruminantium*, infecta monocitos y macrófagos. *Ehrlichia ewingii* infecta granulocitos y *E. ruminantium* infecta células de endotelio vascular y neutrófilos. El grupo del género *Anaplasma* infecta granulocitos, plaquetas y glóbulos rojos. El grupo *Neorickettsia* infecta monocitos y macrófagos. *Neorickettsia risticii* adicionalmente infecta células del epitelio intestinal y mastocitos (Dumler et al., 2001).

La importancia clínica de esta nueva clasificación es que tal vez los veterinarios se enteren pronto de nuevos agentes rickettsiales y las enfermedades que causan (Greene, 1997).

2.2. ENFERMEDADES EHRLICHIALES EN CANINOS

2.2.1. Ehrlichiosis Monocítica Canina

Causada principalmente por *E. canis* la cual infecta células mononucleares (monocitos y linfocitos). El agente causal es un microorganismo intracelular obligado (Dumler *et al*, 2001)

La *E. canis* puede afectar a múltiples especies, entre ellas cualquiera de la familia Canidae, sosteniéndose que especies como el zorro, coyote y chacal son reservorios naturales (Neer, 2000).

2.2.2. Ehrlichiosis Trombocítica Canina

O trombocitopenia cíclica infecciosa canina es transmitida por la *E. platys* (actualmente *A. platys*) (Dumler *et al*, 2001; Yu *et al*, 2001). La *A. platys*, fue reportada inicialmente en perros de Florida en los Estados Unidos (Harvey *et al*, 1978).

2.2.3. Ehrlichiosis Granulocítica Canina

La especie ehrlichial que infecta a los granulocitos de caninos de manera natural es la *E. ewingii*, que solo ha sido detectada en los Estados Unidos (Dumler *et al*, 2001). Esta es una enfermedad clínicamente importante cuyos principales signos son la cojera y la tumefacción articular con marcha rígida (Neer, 2000)

2.3. EHRLICHIOSIS HUMANA

2.3.1. ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

Históricamente, fue en 1953 cuando se identificó la primera especie de *Ehrlichia* capaz de producir enfermedad en humanos; concretamente, fue en Japón y se trataba de *Ehrlichia sennetsu*, actualmente *Neorickettsia sennetsu* (Misao y Kobayashi, 1955). En 1981-1982 hubo un resurgimiento remarcable de casos de esta enfermedad en la misma zona, después de varios años de virtual ausencia. La enfermedad se ha descrito en el lejano Este y en el Sudeste asiático, y la mayoría de los casos han sido descritos en el oeste de Japón, siendo muy rara en otras latitudes (Rapmund, 1984).

2.3.2. CUADRO CLINICO

Es bastante inespecífico y se caracteriza por fiebre, malestar general, cefalea, mialgias, náuseas y anorexia (Peterson *et al*, 1989; Eng *et al*, 1990; Ristic, 1990). Posteriormente aparece linfadenopatía y en un 30% de los casos se describen erupciones cutáneas y sintomatología digestiva. También se pueden observar cuadros neurológicos y respiratorios según la gravedad del proceso (Harkess *et al*, 1989; Eng *et al*, 1990; Rohrbach *et al*, 1990; Harkess, 1991; Bakken y Dumler, 2000). A nivel laboratorial se observa trombocitopenia, leucopenia y anemia (Pearce *et al*, 1988; Eng *et al*, 1990; Bakken *et al*, 1996).

2.4. TRANSMISIÓN POR GARRAPATAS DE LAS EHRLICHIOSIS HUMANA Y ANIMAL

Como ya ha sido señalado, la ehrlichiosis o enfermedad ehrlichial comprende las enfermedades producidas en animales superiores por agentes infecciosos pertenecientes a los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*. La transmisión de estos agentes se produce a través de agentes vectores, garrapatas en el caso de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y nematodos y trematodos en el caso de *Neorickettsia*.

Las garrapatas son parásitos externos pertenecientes taxonómicamente al suborden *Metastignata*, orden *Parasitiformes*, subclase *Acari*, clase *Arachnida*, subphylum *Chelicerata*, phylum *Artropoda*. Existen dos familias: *Ixodidae* o garrapatas duras y *Argasidae* o garrapatas blandas (Hoskins y Cupp, 1988; Cupp, 1991).

Las garrapatas pertenece a uno de los principales grupos de artrópodos que afectan la salud animal, ejerciendo una acción patógena directa, derivada de su efecto exfoliatriz, mecánico y tóxico, (Murnaghan y O'Rourke, 1978; Quiroz, 1984) y una acción patógena indirecta, derivada de su capacidad de vehiculizar agentes patógenos (Hoogstraal, 1985).

Cuando las garrapatas vehiculizan agentes patógenos con potencial zoonótico, la salud humana también se encuentra involucrada (Hoogstraal, 1977). Se considera que las garrapatas están solo por detrás de los mosquitos como vectores de enfermedades humanas en el mundo (Parola y Raoult, 2001). Uno de los principales grupos de agentes patógenos, de conocido potencial zoonótico, de los que las garrapatas son vectores son los agentes ehrlichiales. Siendo las garrapatas de la familia *Ixodiade* las principalmente relacionadas con la transmisión de estas enfermedades (Kidd y Breitschwerdt, 2003).

Las garrapatas se encuentran distribuidas mundialmente aunque existe una distribución geográfica particular para cada una de las especies, a su vez cada especie de garrapata es

vector de diferentes agentes patógenos. La existencia de las enfermedades transmitidas por garrapatas en un área geográfica está condicionada a la existencia de la garrapata vector. La identificación de las especies de garrapatas es un factor importante en la detección y diagnóstico de las enfermedades transmitidas por garrapatas y es un prerrequisito para su control y posible erradicación (Cupp, 1991).

Rhipicephalus sanguineus o garrapata marrón del perro se encuentra distribuida mundialmente, es vector entre otros agentes de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, por ello la ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial. Las garrapatas vectores de *Ehrlichia ruminantium* pertenecen a diversas especies de *Amblyoma* que sólo se encuentran en África, de ahí que la enfermedad del corazón de agua de los rumiantes se encuentra limitada a esa área geográfica (Bezuidenhout, 1987; Walker y Olwage, 1987; Camus y Barre, 1987; Deem, 1998). *Ehrlichia ewingii* y *E. chaffensis* son transmitidas por *Amblyoma americana*, garrapata originaria del continente americano (Anziani et al, 1991; Murphy et al, 1998). *Ixodes ricinus* es la garrapata vector de *Anaplasma phagocytophilum* distribuida tanto en el continente americano como el europeo (Cupp, 1991).

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, cada uno de sus estadios evolutivos necesitan sangre como fuente nutritiva y en los adultos es necesaria para la producción de esperma y huevos (Cupp, 1991). Las garrapatas presentan cuatro estados evolutivos en su ciclo vital: huevo, larva hexápoda, ninfa octópoda y adulto, las dos últimas son las más importantes como vectores de enfermedades (Kidd y Breitschwerdt, 2003). La transformación entre un estado evolutivo y otro requiere de una o más mudas y puede necesitar de uno, dos o más huéspedes, esto tiene su importancia a la hora de su función como vector de enfermedades.

Las garrapatas inciden la piel del hospedador con el par de quelíceros y posteriormente insertan el hipostoma en la herida y lo hacen penetrar en la piel hasta llegar a los capilares

sanguíneos que laceran produciendo un pequeño hematoma desde el que se alimentan (Cupp, 1991). El anclaje de la garrapata al hospedador depende de sus partes bucales, éstas son más o menos grandes dependiendo de la especie, en general las garrapatas con partes bucales más pequeñas producen una sustancia cementante que ancla estrechamente la garrapata al hospedador (Binnington y Kemp, 1980). Las garrapatas inyectan secreciones salivales que contienen sustancias que ayudan a penetrar en la piel del huésped además de alterar localmente la hemostasia y producir una reacción inflamatoria local que facilita la nutrición de la garrapata desde la lesión producida (Tatchell y Moorhouse, 1970; Balashov, 1972; Ribeiro et al., 1985; Ribeiro, 1987).

Algunas garrapatas pueden inocular componentes tóxicos como el responsable de la parálisis flácida (Gothe et al., 1979; Stone, 1988; Stone et al., 1989).

También es a través de la saliva como las garrapatas inoculan agentes patógenos al hospedador. La acción quimiotáctica de las secreciones salivales, atrae a la zona células inflamatorias factibles a ser infectadas por los patógenos inoculados (Berenberg et al., 1972), y puede producir una inmunosupresión local que facilitaría el establecimiento de los patógenos transmitidos en el hospedador (Kopecky et al., 1999).

La garrapata ingresa los patógenos en su organismo al alimentarse de un hospedador infectado, estos llegan al epitelio intestinal y penetran en la cavidad corporal de la garrapata (el hemocele) acompañados del agua y de los iones en exceso que son aprovechados por las glándulas salivales para formar la saliva que será de nuevo inoculada, en ese o en otro hospedador, permitiendo la transmisión de los agentes infecciosos ingeridos con la comida (Tatchel, 1967; tatchell. 1969; Sauer, et al, 1986).

Existe una transmisión transestadial de los patógenos vehiculizados por las garrapatas, de tal manera que una infección adquirida en el estadio de ninfa se mantendrá hasta el adulto,

pudiendo infectar a más de un huésped a lo largo de su desarrollo (Cupp, 1991). La transmisión transovárica, desde la garrapata hembra a su progenie, no parece jugar un papel importante en la transmisión natural de las enfermedades ehrlichiales. Así mientras Donatien y Lestoquard en 1937 indicaban la existencia de transmisión transestadial y transovárica de *E. canis* en *R. sanguineus*, estudios posteriores demuestran que la transmisión es exclusivamente transestadial (Groves et al., 1975; Smith et al., 1976).

Los generos de garrapatas de la familia *Ixodidae* de mayor importancia médica, por su capacidad de transmisión de patógenos, son: *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Boophilus*, *Amblyoma* y *Haemaphysalis*.

El espectro del hospedero suele ser amplio, no estando limitado a un hospedador específico, aunque suelen existir preferencias. Estas características y la transmisión gtransestadial de patógenos, determinan la posibilidad de transmisión de la nfermedad entre distintas especies (Hoskings, 1991).

Las garrapatas son longevas y son capaces de mantenerse vivas, sin alimentarse, por periodos prolongados en cualquiera de sus estadios de desarrollo. En general el desarrollo de las garrapatas viene favorecido por climas cálidos, ya que no son capaces de soportar condiciones extremas de frio y humedad, sin embargo pueden buscar protección en casas, madrigueras, perreras, etc, pudiendo sobrevivir en climas fríos (Kidd y Breitschwerdt, 2003).

La longevidad de las garrapatas, su potencial reproductivo y la posible transmisión transovárica de algunos patógenos hace que las garrapatas no sólo puedan actuar como vectores de enfermedades, sino también como reservorios de patógenos (Cupp. 1991).

La ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial acorde a la distribución de su vector: *Rhipicephalus sanguineus* (Cordero del Campillo, 1980; Hoskins, 1991). Esta garrapata es además capaz de vehiculizar otros agentes patógenos como: *Ehrlichia platys*,

Hepatozoon canis, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* y *Haemobartonella canis*, por lo que no es raro encontrar más de una enfermedad asociada en el mismo animal (Hoskins y Cupp, 1988; Woody y Hoskins, 1991, Simpson et al., 1991; Breitschwerdt, 2002).

Rhipicephalus sanguineus es también capaz de producir enfermedad paralizante en perros.

En el perro las garrapatas adultas se encuentran fundamentalmente en las orejas, a lo largo de la nuca y en los espacios interdigitales. Las larvas y ninfas se suelen encontrar en las áreas de pelo largo del cuello y en infecciones masivas se pueden encontrar todos los estadios evolutivos en la mayoría de las regiones corporales (Hoskins, 1991).

Rhipicephalus sanguineus es una garrapata de tres hospederos, en zonas tropicales y subtropicales, la garrapata se puede encontrar durante todo el año. En climas mediterráneos su actividad se inicia en primavera perdurando hasta el otoño. En invierno no se encuentran en los animales y en climas fríos no son capaces de sobrevivir, sin embargo pueden encontrar refugio en casas, pajares, perreras, lo que les permite su supervivencia (Cupp, 1991).

Los adultos de *R. sanguineus* son capaces de sobrevivir sin alimentarse hasta 568 días y pueden transmitir *E. canis* hasta 155 días tras haberla ingerido (Lewis et al, 1977), lo que nos muestra su gran potencial, aunque no exista transmisión transovárica del patógeno, tanto como vector tanto como reservorio (Woody y Hoskins, 1991). Por ello, el control de las poblaciones de garrapatas sobre el animal y el medio ambiente es fundamental en la lucha y prevención de las enfermedades ehrlichiales (Keefe et al, 1982; Garris, 1991).

2.5. PATOGENESIS DE LA EHRLICHIOSIS CANINA POR *Ehrlichia canis*

La enfermedad posee un periodo de incubación (PI) de aproximadamente 8 – 20 días (Sainz *et al*, 2000), seguido por una fase aguda o temprana, para posteriormente alcanzar una etapa subclínica asintomática y finalmente llegar a una fase crónica, que es la etapa final de la enfermedad (Harrus *et al*, 1997a; Neer, 2000).

2.5.1. Ingreso del agente y fase aguda

La infección del hospedador vertebrado ocurre después que una garrapata ha ingerido sangre de un animal infectado, de esta forma las secreciones salivales de la garrapata contaminan el área de alimentación en el hospedero susceptible, ocasionando el pasaje del microorganismo vía mecánica. Además, el microorganismo también se transfiere por transfusión sanguínea de donantes infectados, siendo esta última una vía muy poco frecuente (Neer, 2000).

Posterior al periodo de incubación se observa la fase aguda, la cual tiene una duración de 2 a 4 semanas. En esta fase se multiplican los microorganismos en células mononucleares (macrófagos y linfocitos) por fisión binaria y se diseminan a la totalidad del cuerpo (Neer, 2000; Ettinger, 1992). La replicación inicialmente se da en leucocitos mononucleares circulantes, los que luego, colonizan los órganos conformados por células de tipo mononuclear, tales como el bazo, hígado, médula ósea y nódulos linfáticos donde provocan una hiperplasia con infiltración de células plasmáticas (Neer, 2000).

La trombocitopenia, es el hallazgo más común y consistente en la ehrlichiosis canina (Warner *et al*, 1995), así como la anemia y la leucopenia (Neer, 2000; Ettinger, 1992) estas anomalías hematológicas rara vez se presentan simultáneamente y son más típicas diversas combinaciones (Greene, 1997).

En esta etapa la hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (hipergammaglobulinemia) son las anormalidades químicas predominantemente encontradas en perros infectados con *E. canis* (Harrus *et al.* 1996c).

En esta etapa suelen afectarse los riñones por factores humorales. En las infecciones agudas es común que haya alteraciones de la permeabilidad glomerular. La pérdida de proteínas depende de una glomerulopatía de cambios mínimos. Las tinciones inmunofluorescentes revelan depósitos leves a moderados de inmunoglobulinas en los ovillos glomerulares y el mesangio. Esos cambios patológicos explican la pobre respuesta a la antibioticoterapia en los casos de ehrlichiosis con glomerulonefritis (Greene, 1997).

2.5.2. Fase subclínica o silenciosa

La fase subclínica se establece cuando el animal sobrevive a la fase aguda y se presenta de manera espontánea o por un tratamiento inefectivo (Harrus *et al.*, 1998). Se caracteriza por la persistencia del microorganismo y el alza en los títulos de anticuerpos. Tiene una duración promedio de 6 a 9 semanas pudiendo permanecer por varios años.

2.5.3. Fase final o crónica

En esta etapa de la enfermedad se pueden presentar cuadros leves, manifestando una enfermedad vaga con pérdida de peso y con alteraciones hematológicas moderadas. La forma grave se caracteriza por deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos que da por resultado pancitopenia. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del microorganismo, cuando hay una enfermedad concomitante en algunas razas (Pastos Alemán) y en los animales jóvenes (Neer, 2000).

2.6. CUADRO CLINICO

Se distinguen tres fases en esta enfermedad tanto a nivel del cuadro clínico como de la patogenia, si bien clínicamente no siempre es sencillo conocer la fase de la enfermedad. Este hecho se debe a que, aunque para cada una de estas fases se describe un cuadro clínico con predominio de una sintomatología concreta, una gran variedad de signos clínicos pueden aparecer tanto en la fase aguda como en la crónica (Huxoll *et al*, 1970; Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991). La fase subclínica es probablemente la más sencilla de identificar puesto que se caracteriza por la ausencia de sintomatología, apareciendo únicamente alteraciones biopatológicas (Woody y Hoskins, 1991; Sainz *et al*, 1996).

Una vez que se ha producido la entrada de *Ehrlichia spp.* en el organismo, el periodo de incubación de la enfermedad viene a durar de 9 a 14 días, tras los cuales comienzan a aparecer las primeras manifestaciones de la enfermedad que se corresponden en el tiempo con la fase aguda de la enfermedad. Ésta suele durar de 4 a 7 semanas. La presencia de garrapatas debería observarse en esta fase; sin embargo, no es un signo constante y sólo se ha constatado en un 40% de los animales afectados (Troy *et al* 1980; Greene *et al*, 1985). Por supuesto el contacto con garrapatas es imprescindible para el desarrollo de la enfermedad, por lo que en zonas endémicas realizar una buena anamnesis demandando información sobre el contacto con los vectores es fundamental (Woody y Hoskins, 1991; Breitschwerdt, 2003).

En fases crónicas se puede desarrollar una glomerulopatía inmunomediada que produce una insuficiencia renal la cual no suele responder al tratamiento. En estos casos la sintomatología asociada es la clásica de una insuficiencia renal crónica: poliuria, polidipsia, anorexia, vómitos o úlceras orales (Troy *et al*, 1980; Codner y Maslin, 1992).

2.7. ALTERACIONES LABORATORIALES EN EL CURSO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

A continuación vamos a analizar las principales alteraciones laboratoriales observadas en la ehrlichiosis canina.

2.7.1. ALTERACIONES HEMATÓLOGICAS

La **trombocitopenias** es casi un factor constante en la infección por *Ehrlichia*, apareciendo a los 15-20 días post-infección y pudiendo persistir durante todas las fases de la enfermedad (Troy et al, 1980; Greene et al, 1985; Kuehn y Guant, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt et al, 1987; Waddle y Litman, 1988; Davoust et al, 1991^a; Harrus et al, 1997). Sin embargo, se han descrito casos de ehrlichiosis sin trombocitopenias, (Woody y Hoskins, 1991; Frank y Breitschwerdt, 1999). La patogenia de la trombocitopenia es compleja y multifactorial, participando mecanismos inmunológicos que producen una disminución de la producción y un aumento de la destrucción de plaquetas (Weisiger et al, 1975; Harrus et al, 1996b; Grindem et al, 1999).

Uno de los mecanismos inmunológicos que intervienen en la trombocitopenia por ehrlichiosis es la producción de anticuerpos antiplaquetarios. Estos anticuerpos se han encontrado en elevadas cantidades tanto en perros tras la infección experimental o natural, (Harrus et al, 1996b; Buhles et al, 1974; Lewis et al, 1975; Waner et al, 1995; Grindem et al, 1999; Waner et al, 2000^a) como en personas afectadas por ehrlichiosis (Wong y Thomas, 1998). En el perro estos anticuerpos se encuentran en unos niveles elevados a partir del séptimo día post-infección, luego comienzan a disminuir hacia el día 29, desapareciendo en el día 75 (Grindem et al, 1999). Para otros autores la trombocitopenia

llega a su máxima expresión sobre el día 30 y posteriormente comienza a recuperarse (Reardon y Pierce, 1981). La trombocitopenia en la fase aguda de la infección podría ser debida fundamentalmente a una destrucción plaquetaria inducida por la presencia de estos anticuerpos. Se han sugerido diversos mecanismos por los que los anticuerpos antiplaquetarios participan en la génesis de la trombocitopenia; favorecen el secuestro de plaquetas recubiertas de anticuerpos por el bazo y otros tejidos linfoides; favorecen la destrucción plaquetaria prematura por fijación del complemento o fagocitosis; inducen disfunción plaquetaria que conduce el sangrado, aún con la presencia de un número normal de plaquetas; afectan el ritmo de producción plaquetaria (Kakoma et al, 1997; Harrus et al, 1996b; Frank y Breitschwerdt, 1990; Grindem et al, 1999).

Además se han descrito otros mecanismos que intervienen en la patología de la trombocitopenia como la existencia de un factor supresor de la migración plaquetaria sintetizado por los linfocitos B (Abeygunawardena, 1988; Ristic y Holland, 1993).

De todo ello se deduce que en la fase aguda de la infección, la trombocitopenia es generada por una disminución de la vida media plaquetaria más que por un descenso en la producción de plaquetas (Reardon y Pierce, 1981). En esta fase llega incluso a observarse el incremento de la prombopoyesis (Waner et al, 1995), mientras que, en la fase crónica de la enfermedad, la principal causa de trombocitopenia sería la hipoplasia de médula ósea (Woody y Hoskins, 1991).

La fase aguda de la ehrlichiosis puede cursar con **anemia** producida por la destrucción acelerada de eritrocitos por mecanismos inmunológicos (Buhles et al, 1974; Reardon y Pierce, 1981). En esta fase la anemia normalmente es regenerativa (Woody y Hoskins, 1991) ya que la médula ósea suele ser hipercelular (Buhles et al, 1975). Un elevado número de perros con anemia regenerativa serán positivos al test de Coombs, lo cual debe ser tomado en cuenta para no incurrir en errores diagnósticos (Greene et al, 1985). Durante la

fase subclínica, el recuento de eritrocitos generalmente se normaliza (Buhles et al, 1974), aunque se pueden encontrar casos con ausencia de sintomatología clínica y presencia alteraciones hematológicas (Codner y Farris-Smith, 1986). En la fase crónica, la anemia será no regenerativa debido a la destrucción continua de eritrocitos, la pérdida crónica de sangre y la existencia de hipoplasia o aplasia medular (Hildebrand et al, 1973; Buhles et al, 1974; Woody y Hoskins, 1991; Makinde y Bobade, 1994).

El recuento de leucocitos en sangre es variable, encontrando inicialmente una ligera **leucopenia** (Buhles et al, 1974; Reardon y Pierce, 1981) debido al secuestro de leucocitos motivado por procesos inmunológicos e inflamatorios (Ristic, 1976). Esta leucopenia puede transformarse posteriormente en leucocitosis (Hibler et al, 1986). Se ha descrito una inversión de la fórmula leucocitaria en perros con ehrlichiosis, con presentación de una neutropenia y una linfocitosis relativa (Sainz, 1996), también se ha reseñado la existencia de linfocitosis granular (Weiser et al, 1991; Heeb et al, 2003).

Estas citopenias (anemia, leucopenia, trombocitopenia) son mucho más graves en la fase crónica y se suelen asociar a una hipoplasia medular; habiéndose observado incluso la aparición de aplasia medular completa con cuadro severo de pancitopenia que desemboca en la muerte del perro (Hildebrand et al, 1973; Buhles et al, 1974; Waddle y Littman, 1988; Makinde y Bobade, 1994). Otros procesos inmunológicos, además de la producción de citoquinas participan en estas citopenias de fase crónica. No obstante, en la fase crónica de la enfermedad suele observarse una plasmocitosis debido al estímulo antigénico crónico (Hildebrandt et al, 1973; Weisiger et al, 1975; Kuehn y Gaunt, 1985).

La leucopenia observada en el curso de la ehrlichiosis, motivada por una depleción del número de neutrófilos, se puede presentar con un aumento de células inmaduras que carecen de capacidad fagocitaria y de combustión respiratoria óptima lo que incrementa la

susceptibilidad de estos pacientes a otras infecciones (Taylor et al, 1941; Woldehiwet, 1987; Whist et al, 2003).

La función de los leucocitos también puede verse alterada, así, los linfocitos de perros con ehrlichiosis pueden producir un factor con efecto citotóxico sobre monocitos autólogos (Kakoma et al, 1977).

2.8. DIAGNOSTICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

2.8.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Tal y como se ha abordado previamente, el cuadro clínico de la ehrlichiosis canina es totalmente inespecífico: depresión, letargia, pérdida de peso, anorexia, fiebre, linfadenomegalia (Huxsoll *et al* 1970; Greene y Harvey, 1984; Breitschwerdt *et al*, 1987; Waddle y Littman, 1988; Troy *et al*, 1980; Khuen y Gaunt, 1985; Greene *et al*, 1985; Sainz, 1996). Estos signos clínicos pueden aparecer en numerosas enfermedades y no siempre aparecen conjuntamente en el curso de la ehrlichiosis canina. Por otro lado, el cuadro clínico de la ehrlichiosis también varía en función del animal y de la fase de la enfermedad.

2.8.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Debido a la gran variedad de signos clínicos con los que cursa la ehrlichiosis, el diagnóstico diferencial debe incluir numerosas patologías. Sin embargo, la leishmaniosis, es la enfermedad con la que más frecuentemente se puede confundir, debido a la similitud de muchos de sus signos: hemorragias, apatía, pérdida de peso, linfadenopatía, uveítis, hiperproteinemia con hiperglobulinemia, artritis, etc. (Sainz, 1996).

También se debe diferenciar de otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la babesiosis o la hepatozoonosis.

Otra patología con sintomatología y alteraciones en la analítica sanguínea similares es el lupus eritematoso sistémico (Kelly *et al*, 1994a).

La presencia de linfocitosis granular o la afectación de la médula ósea podría confundirla con procesos neoplásicos como el mieloma, la leucemia linfoblástica aguda o la leucemia linfocítica crónica (Weiser *et al*, 1991; Heeb *et al*, 2003).

2.8.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

PRUEBAS LABORATORIALES INESPECÍFICAS

Los resultados de pruebas como la hematología y la bioquímica sanguínea pueden ayudar al diagnóstico de ehrlichiosis canina. Entre los hallazgos que nos pueden hacer sospechar de la presencia de esta enfermedad se encuentra la **trombocitopenia**. Es éste el hallazgo más frecuente en perros con ehrlichiosis canina, apareciendo a los 15-20 días postinfección y pudiendo perdurar durante todas las fases de la enfermedad (Troy *et al*, 1980; Greene *et al*, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt *et al*, 1987; Waddle y Littman, 1988; Davoust *et al*, 1991a).

PRUEBAS LABORATORIALES ESPECÍFICAS

Examen microscópico del agente etiológico

La **observación de mórulas** o inclusiones intracelulares compatibles con *E. canis* en el interior de monocitos y/o linfocitos de sangre circulante es diagnóstico de la infección (Elias, 1991; Mylonakis *et al*, 2003). Sin embargo, es difícil la observación de estas formas debido a su pequeño tamaño y a que el total de células mononucleares infectadas suele ser inferior al 1%; este porcentaje se va reduciendo a medida que evoluciona la enfermedad (French y

Harvey, 1983; Cowell *et al*, 1988). También se han observado estas mórulas en leucocitos procedentes de líquido cefalorraquídeo, líquido articular y de lavado prostático (Bellah *et al*, 1986; Cowell *et al*, 1988; Marezki *et al*, 1994; Meinkoth *et al*, 1998).

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

La parte clínica se realizó en EL Consultorio Veterinario "CUATRO PATAS", ubicado en Río Chancay 12, urbanización Federico Villarreal en la ciudad de Chiclayo, también se obtuvo las muestras de sangre para ser enviadas al Laboratorios de Análisis Clínicos y Microbiológicos "A&C", ubicado en la calle Juan Cuglievan 884- Oficina 203.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO Y EQUIPO

3.2.1. De los animales. Para la presente investigación se emplearon 66 caninos de diferente raza, sexo, edad, procedencia sospechosos a la enfermedad a los cuales los dueños permitieron obtener todas las muestras de sangre necesarias, y portadores de garrapatas o con exposición anterior a las mismas.

3.2.2. De las muestras.

Sangre periférica extraída de la cara interna del pabellón auricular del canino para la realización del frotis sanguíneo.

Muestra de sangre obtenida de la vena cefálica del miembro anterior para la realización del hemograma.

3.2.3. Material y equipo de laboratorio.

- Lancetas de Frank
- Laminas portaobjetos de 3" x 1" x 1,0 mm de espesor
- Tinción Wright
- Agua destilada
- Cronómetro

- Aceite de inmersión
- Microscopio Binocular de luz incorporada
- Cámara digital.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Fase Clínica

- A. La anamnesis del paciente consistió en obtener la mayor información posible del mismo de enfermedades anteriores, la información básica necesaria era edad, raza, antecedentes de garrapatas, procedencia, rol vacunal y el examen clínico el cual se realizó con gran cuidado teniendo en cuenta temperatura, color de mucosas, tiempo de llenado capilar, palpación abdominal, auscultación pulmonar y cardíaca, color de heces y orina entre otros.
- B. Toma de las muestras de sangre

1. Para la observación de la mórula de *Ehrlichia spp*

Posterior a la tricotomía y desinfección de la cara interna del pabellón auricular se procedió hacer la punción de punta de oreja para obtener una gota de sangre la cual fue utilizada en el frotis sanguíneo se dejó secar a temperatura ambiente posterior a su rotulado.

2. Para el hemograma

Posterior a la tricotomía y desinfección del miembro anterior sobre la vena cefálica se procedió a la punción para obtener la muestra necesaria de 1-2 ml de sangre para remitir a laboratorio,

3.3.2. Trabajo de laboratorio

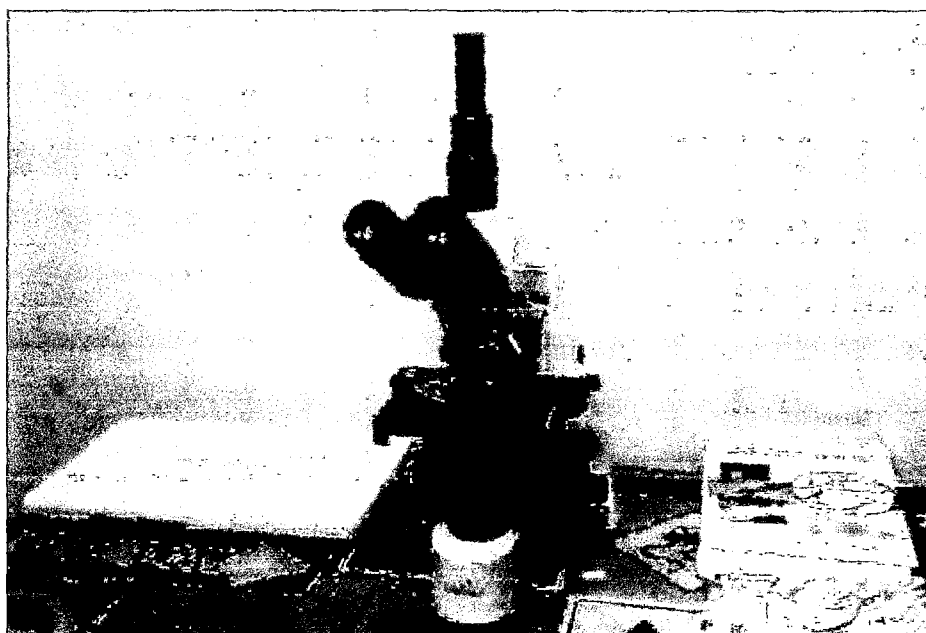
A. Para la observación de la mórula de *E. canis* en el frotis sanguíneo.

1. Tinción de los frotis sanguíneos

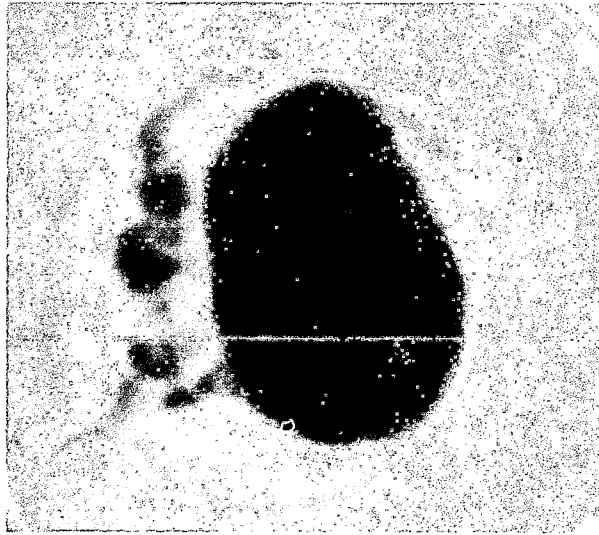
La lámina con el frotis fue teñida con el colorante Wright y se procedió a la tinción: Con un gotero se aplicó suficiente cantidad de colorante de tal manera que aún al evaporarse, la lámina este siempre cubierta de colorante. Se dejó actuar el colorante por 3 minutos. Luego se colocó agua destilada sobre la lámina con colorante sin dejar que se derrame por los costados, procediéndose luego a homogenizar la mezcla soplando suavemente con una manguerilla de goma, hasta que salga un brillo metálico en la superficie. Se dejó actuar la misma por 6 minutos y luego se procedió al lavado de la muestra con agua destilada. Se dejaron secar los frotis al temperatura ambiente.

2. Identificación de Ehrlichia spp

Tuvo como finalidad la observación de la mórulas de *Ehrlichia* spp. Se utilizó un microscopio compuesto de luz incorporada. Los frotis fueron observados a 1000 aumentos con aceite de inmersión, se utilizó el método de almenas (laberinto) para el examen de los mismos. Las mórulas de *E. canis*. se tiñen de color púrpura con Wright (Sainz y col., 2000) se observaron en el citoplasma de monocitos, linfocitos y algunos neutrófilos, en forma de inclusiones bien definidas (redondas u ovaladas).



**FIGURA 1: MICROSCOPIO PARA LA OBSERVACION DE MORULAS
INTRACITOPLAMATICA DE *Ehrlichia spp***



**FIGURA 2: INCLUSIONES CITOPLASMICAS EN MONOCITO COMPATIBLES
CON *Ehrlichia* spp.**

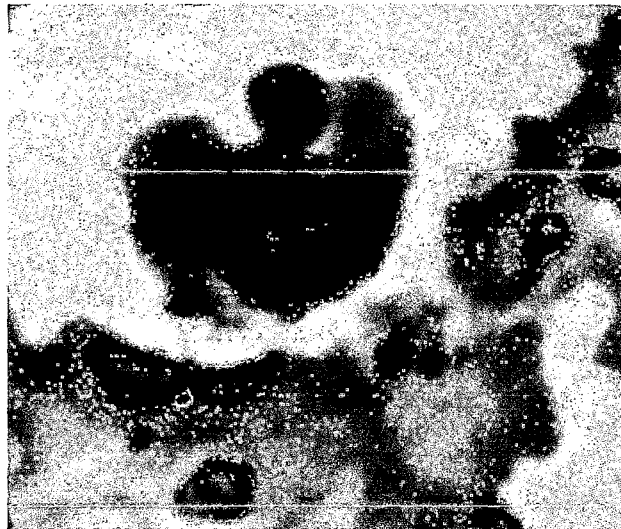


FIGURA 3: MORULA DE *Ehrlichia* spp EN NEUTROFILO

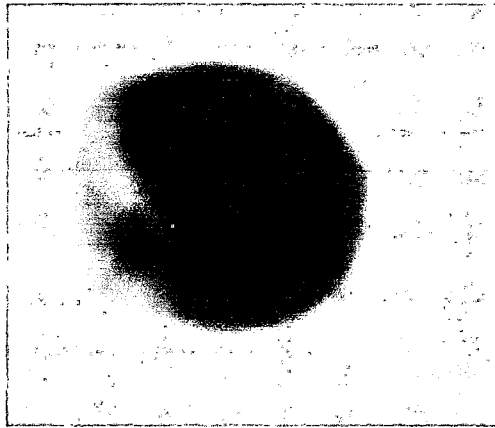


FIGURA 4: MORULA EN LINFOCITO

B. Para la realización del hemograma

Se realizó en el laboratorio "A&C"- Chiclayo para la determinación de alteraciones hematológicas concordantes con la enfermedad. Neer (2000) presentó el siguiente orden, basándose en las frecuencias de las mismas en múltiples casos de ehrlichiosis canina:

- 1) Trombocitopenia
- 2) Anemia
- 3) Leucopenia
- 4) Pancitopenia

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados del examen hematológico y la observación microscópica de la mórula de *Ehrlichia spp* obtenidos de los 66 casos sospechosos en el presente estudio, fueron analizados estadísticamente para determinar la RELACIÓN entre ambas pruebas mediante el método estadístico de Chí. Cuadrado determinando la asociación (significancia estadística) de presencia de trombocitopenia, presencia de leucopenia, presencia de anemia y antecedente de garrapatas así como para las variables edad, raza, sexo en los casos en estudio, respecto a la presencia de la enfermedad.

Finalmente, se analizaron las frecuencias encontradas respecto a la presentación de cuadros citopénicos (asociaciones citopénicos más frecuentes) así como las frecuencias halladas respecto a los signos clínicos en los animales evaluados. Estos datos son de suma importancia diagnóstica a nivel hematológico, así como a nivel clínico para una mejor detección de los pacientes con ehrlichiosis canina en nuestro medio.

Hipótesis:

H₀: No existe relación (asociación) entre las variables

H₁: Existe relación (asociación) entre las variables

Nivel de Significancia: $\alpha = 0.05$

Estadística de Prueba Chi- cuadrado

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

X²= 0.095

O= Observados

E= Esperados

I.V. RESUTADOS

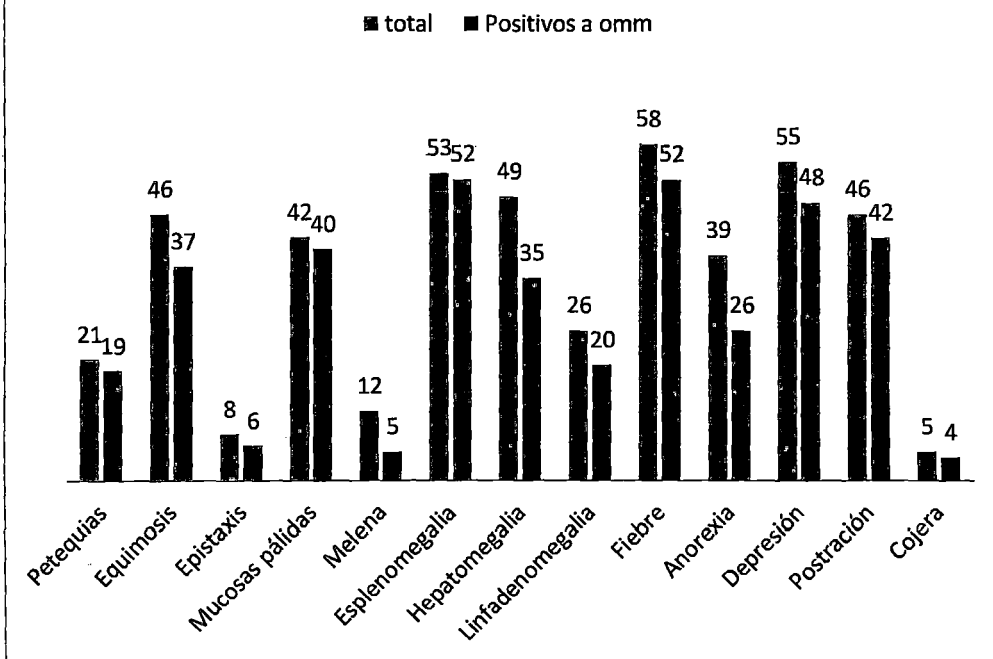
4.1. DE LOS HALLAZGOS CLINICOS

En el cuadro 1 y figura 5 se observan los signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis canina de los 66 casos sospechosos a la enfermedad, determinándose que los canes con esplenomegalia 98.11%, mucosas pálida 95.23%, postración 91.3%, petequias (piel y mucosas) 90.47% y fiebre 89.65% nos dan un alto porcentaje de positividad a la enfermedad, mientras que los canes con melena y anorexia resultaron en un porcentaje más bajo.

CUADRO 1: RELACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS COMPATIBLES CON EHRlichiosis CANINA Y LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MÓRULAS (omm) DE *Ehrlichia spp.*

SIGNOS	Nº	POSITIVOS	A omm	NEGATIVOS	A omm
CLINICOS		Nº	%	Nº	%
Petequias	21	19	90.47	2	9.53
Equimosis	46	37	80.43	9	19.57
Epistaxis	8	6	75	2	25
Mucosas pálidas	42	40	95.23	2	4.77
Melena	12	5	41.66	7	58.34
Esplenomegalia	53	52	98.11	1	1.89
Hepatomegalia	49	35	71.42	14	28.58
Linfadenomegalia	26	20	76.92	6	23.08
Fiebre	58	52	89.65	6	10.35
Anorexia	39	26	66.66	13	33.34
Depresión	55	48	87.27	7	12.73
Postración	46	42	91.3	4	8.7
Cojera	5	4	80	1	20

FIGURA 5:
RELACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS
COMPATIBLES CON EHRlichiosis
CANINA Y LA OBSERVACIÓN
MICROSCÓPICA DE MÓRULAS DE
Ehrlichia spp.



4.2. DE LOS RESULTADOS HEMATOLOGICOS

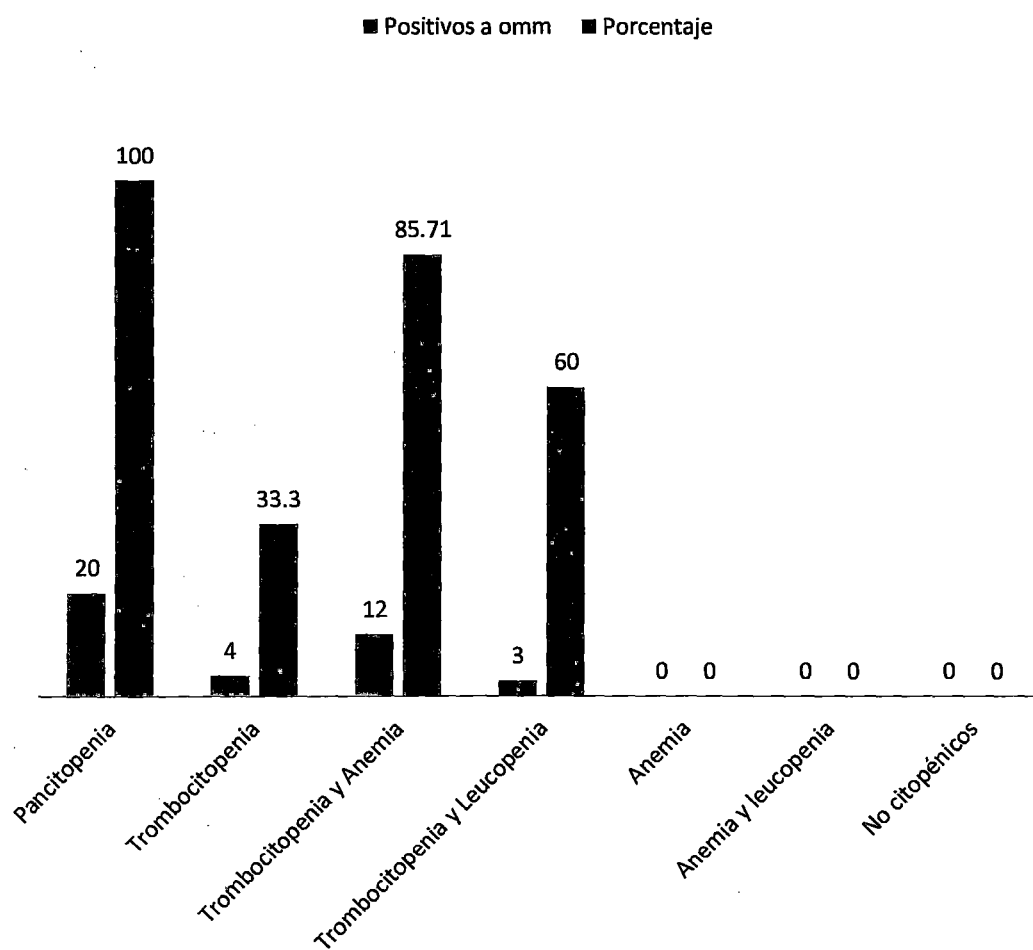
En el cuadro 2 y figura 6 se determina la relación entre las diversas citopenias y la presencia de la enfermedad:

Se encontró que la pancitopenia representa un 100% de positividad de los canes a padecer de la enfermedad y a la observación de la mórula en conjunto con la bicitopenia trombocitopenia-anemia representa un 85.71% de positividad que en contraste estas con los no citopénicos y bicitopénicos anemia-leucopenia que son negativos en un 100% a la enfermedad y presencia de mórulas de *Ehrlichia canis*.

CUADRO 2: ANALISIS DE LAS CITOPENIAS ENCONTRADAS EN LOS 66 CASOS COMPATIBLES CON EHRLICHIOSIS CANINA FRENTE A LA OBSERVACIÓN DE MORULAS DE *Ehrlichia spp.*

CITOPENIAS	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL
	Nº	A omm %	Nº	A omm %	
Pancitopenia	20	100	0	-	20
Trombocitopenia	4	33.3	8	66.7	12
Trombocitopenia y Anemia	12	85.71	2	14.29	14
Trombocitopenia y Leucopenia	3	60	2	40	5
Anemia	0	-	0	-	0
Anemia y leucopenia	0	-	1	100	1
No citopénicos	0	-	0	-	0

FIGURA 6:
ANALISIS DE LAS CITOPENIAS ENCONTRADAS
EN LOS 66 CASOS COMPATIBLES CON
EHRlichiosis CANINA FRENTE A LA
OBSERVACIÓN DE MORULAS DE *Ehrlichia*
spp.



En el cuadro 3 y figura 7 se avalúa la presencia de trombocitopenia con relación a la enfermedad encontrándose un 76.92% \pm 9.67 de positividad de los canes con esta alteración hematológica mediante la observación de la mórula de *E. canis* en el frotis sanguíneo.

No se encontró significancia estadística a la prueba de Chi-cuadrado.

CUADRO 3: RELACION ENTRE TROMBOCITOPENIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

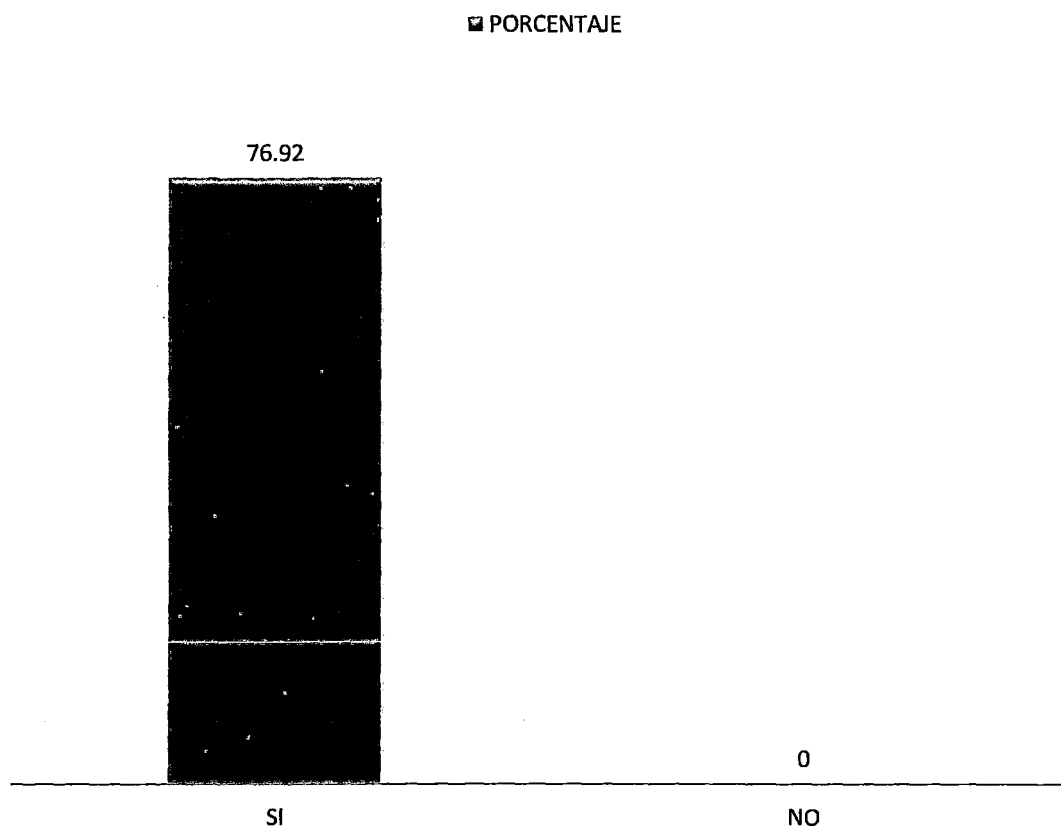
TROMBOCITOPENIA	N°	POSITIVOS	A omm	I.C.
		N°	%	
SI	65	50	76.92	9.67
NO	1	0		
TOTAL	66	50		

$$X^2_t = 3.84$$

$$g.l. = 1$$

$$X^2_c = 1.083$$

FIGURA 7:
RELACION ENTRE TROMBOCITOPENIA Y
OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA
(omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN
ESTUDIO.



En el cuadro 4 y figura 8 se evaluó la relación entre leucopenia y la enfermedad encontrándose un 72.41%± 0.42% de positividad de los canes con dicha alteración hematológica mediante la observación de la mórula de *E. canis* en el frotis sanguíneo; asimismo los canes que no tenían dicha alteración resultaron en un 65% positivos a la enfermedad.

Asimismo se encontró q SI hay significancia estadística a la prueba de Chi cuadrada en la enfermedad.

CUADRO 4: RELACION ENTRE LEUCOPENIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

LEUCOPENIA	N°	POSITIVOS	A omm	I.C.
		N°	%	
SI	26	24	92.3	0.42
NO	40	26	65	
TOTAL	66	50		

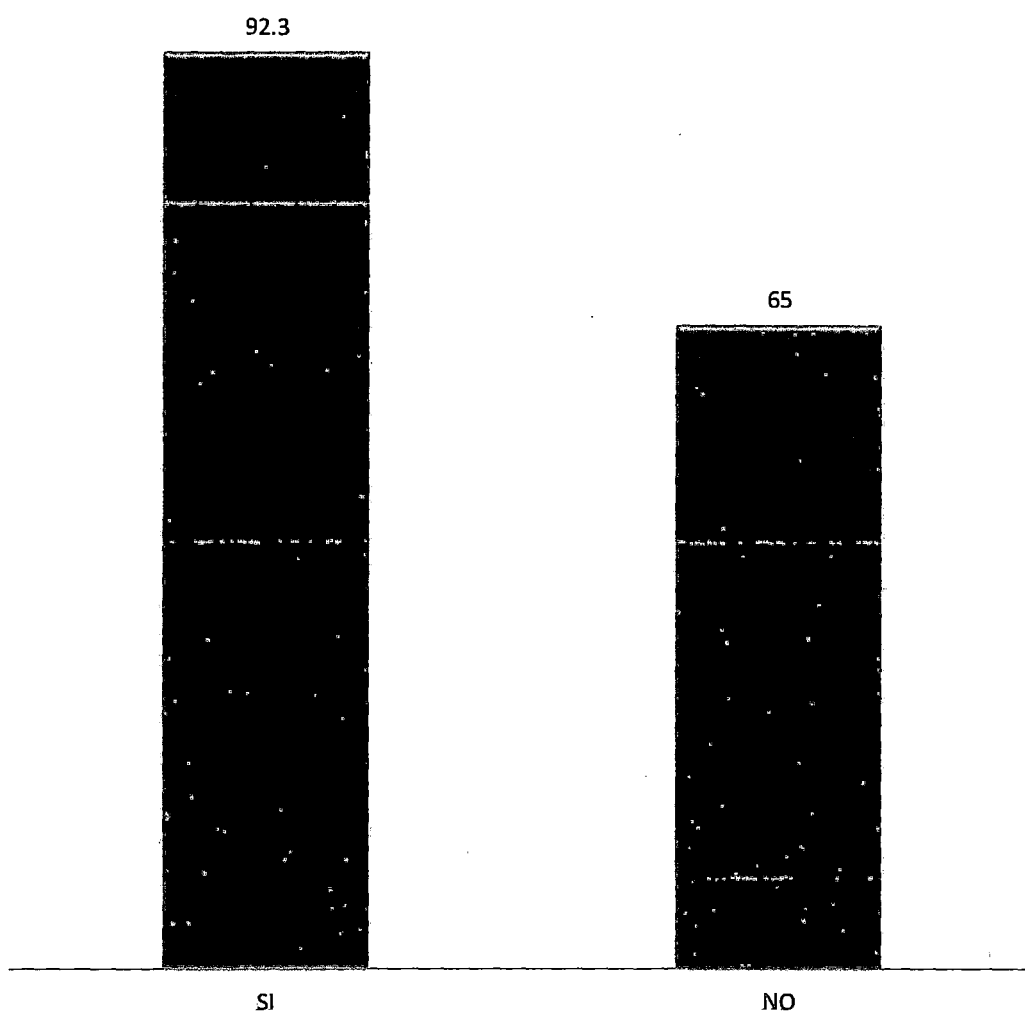
$$X^2_t = 3.84$$

$$g.l. = 1$$

$$X^2_c = 5.59$$

FIGURA 8:
RELACION ENTRE LEUCOPENIA Y
OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA
(omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN
ESTUDIO.

■ PORCENTAJE



En el cuadro 5 y figura 9 se evaluó la presencia de anemia con relación a la enfermedad encontrándose un $87.75\% \pm 0.63\%$ de positividad de los canes con dicha alteración hematológica mediante la observación de la morula de *E. canis* en el frotis sanguíneo; sin embargo los pacientes que no presentaron anemia son un $41.17\% \pm 0.39\%$ de positividad a la enfermedad.

Asimismo a la prueba estadística de Chi-cuadrado ($P < 0.05$) se determinó que Si existe asociación entre anemia y la presencia de la enfermedad.

CUADRO 5: RELACION ENTRE ANEMIA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

ANEMIA	N°	POSITIVOS	A omm	I.C.
		N°	%	
SI	49	43	87.75	0.63
NO	17	7	41.17	0.39
TOTAL	66	50		

0.05 de nivel de significancia

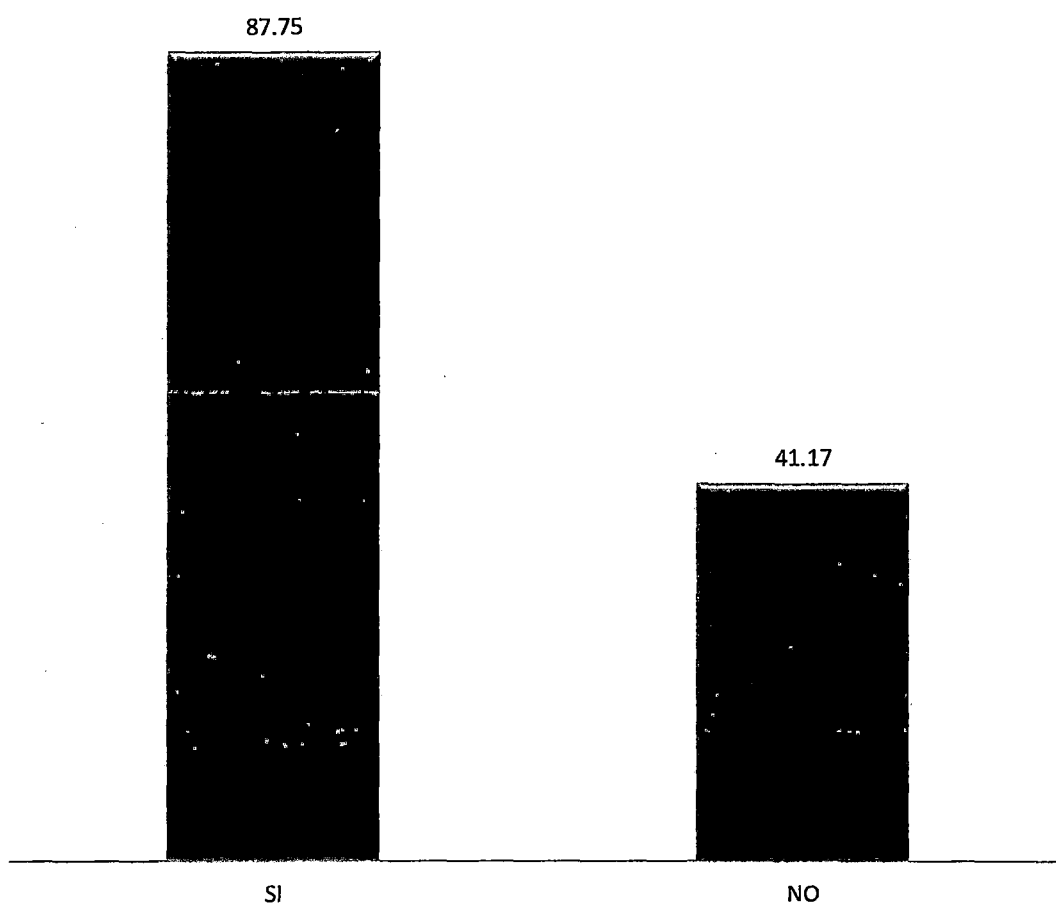
$$X^2_t = 3.84$$

$$g.l. = 1$$

$$X^2_c = 15.74$$

FIGURA 9:
RELACION ENTRE ANEMIA Y OBSERVACION
MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE
***Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO**

■ PORCENTAJE



4.3. OTRAS VARIABLES EN ESTUDIO

En el cuadro 6 y figura 10 se evaluó el antecedente y exposición a garrapatas con relación a la presencia de la enfermedad encontrándose un 80.32% de positividad de los canes diagnosticados con la observación de la mórula de *E. canis*; asimismo los canes que no tenían ningún antecedente de las mismas resultaron en un 20% positivos a la enfermedad.

A la prueba estadística de Chi cuadrado ($P < 0.05$), se determinó que SI hay significancia estadística y asociación entre las variables.

CUADRO 6: RELACION ENTRE ANTECEDENTES DE GARRAPATAS Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

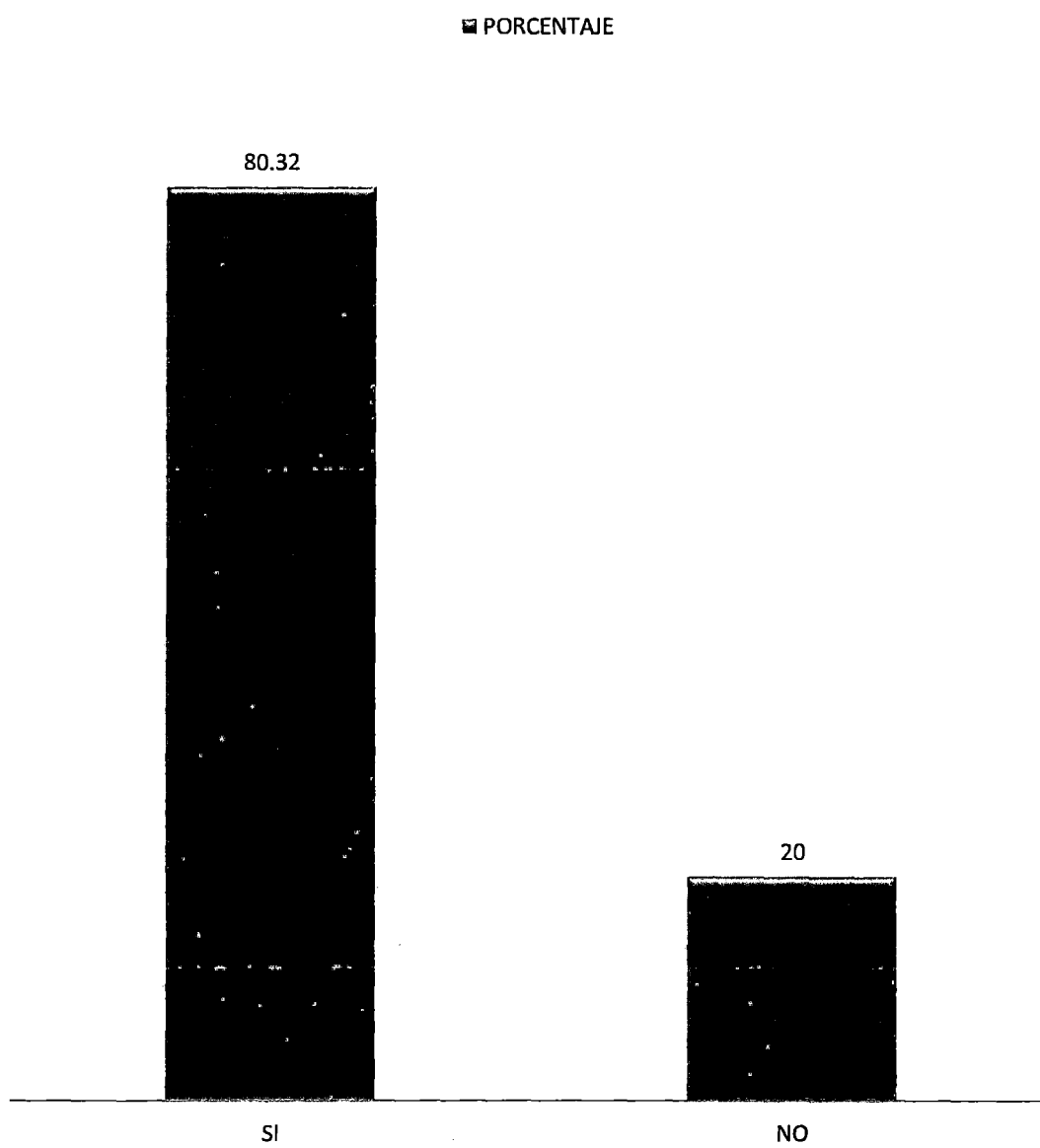
ANTECEDENTES DE GARRAPATAS	N°	POSITIVOS N°	A omm %
SI	61	49	80.32
NO	5	1	20
TOTAL	66	50	

$$X^2_t = 3.84$$

$$g.l. = 1$$

$$X^2_c = 12.04$$

FIGURA 10:
RELACION ENTRE ANTECEDENTES DE
GARRAPATAS Y OBSERVACION MICROSCOPICA
DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS
66 CASOS EN ESTUDIO.



En el cuadro 8 y figura 11 la incidencia de padecer la enfermedad es mayor en los machos con un 77.41% que en las hembras con un 74.28%.

En el análisis estadístico de Chi cuadrado NO existe asociación estadística entre las variables.

CUADRO 7: RELACION ENTRE LA VARIABLE SEXO Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

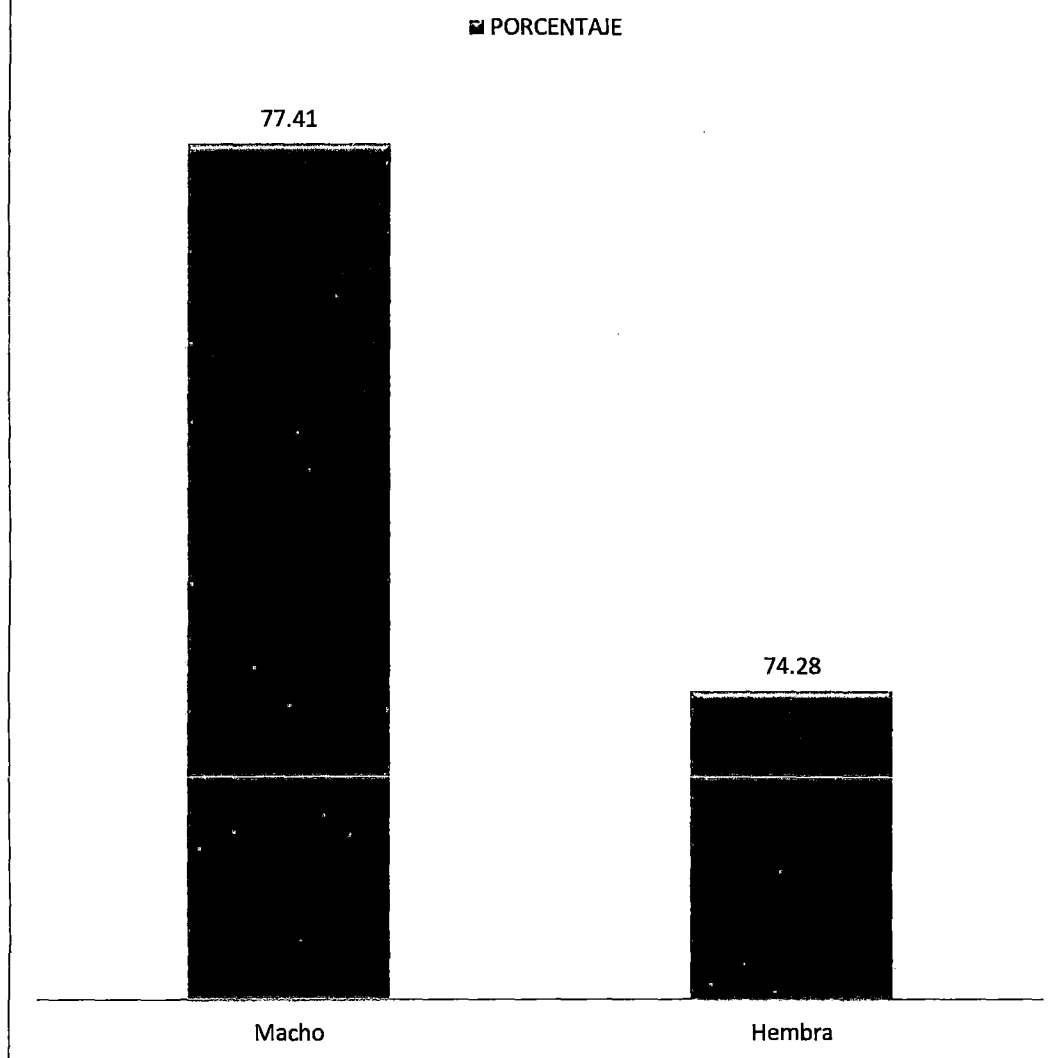
SEXO	N°	POSITIVOS	A omm
		N°	%
Macho	31	24	77.41
Hembra	35	26	74.28
TOTAL	66	50	

$$X^2_t = 3.84$$

$$g.l. = 1$$

$$X^2_c = 0.33$$

**FIGURA 11:
RELACION ENTRE LA VARIABLE SEXO Y
OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA
(omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS
EN ESTUDIO.**



En el cuadro 8 y figura 12 la incidencia de padecer la enfermedad es más alta en canes mayores a los 5 años con un 88.88% de positividad contra los canes que se encuentran entre los 2 y 5 años con un 54.25 de padecer menos la enfermedad.

A la prueba estadística de Chi cuadrado la variable edad NO tiene significancia estadística con relación a la observación de mórulas de *E. canis*.

CUADRO 8: RELACION ENTRE LA VARIABLE EDAD Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia spp* DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

EDAD	N°	POSITIVOS A omm	
		N°	%
HASTA 2 AÑOS	21	18	85.71
DE 2-5 AÑOS	27	16	54.25
MAYOR A 5 AÑOS	18	16	88.88
TOTAL	66	50	

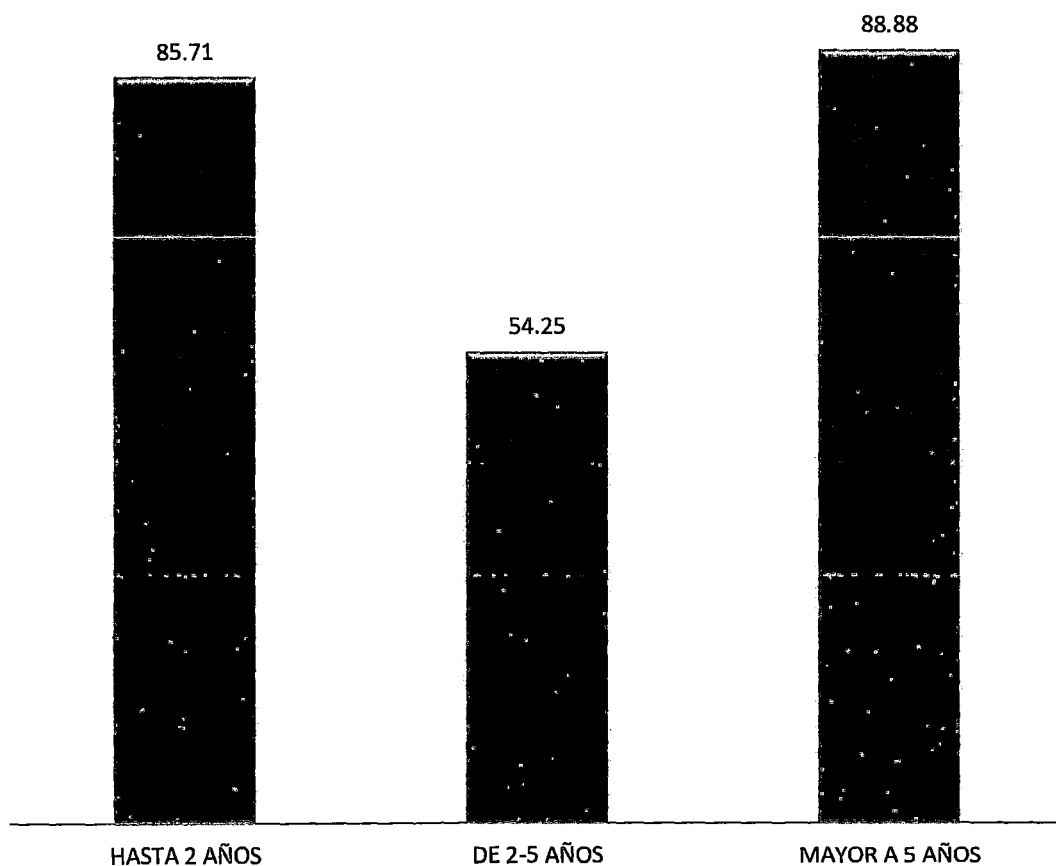
$$X^2_t = 5.99$$

$$g.l. = 2$$

$$X^2_c = 5.41$$

FIGURA 12:
RELACION ENTRE LA VARIABLE EDAD Y
OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA
(omm) DE *Ehrlichia spp* DE LOS 66 CASOS EN
ESTUDIO

■ PORCENTAJE



En el cuadro 9 y figura 13 se muestra que la incidencia de padecer la enfermedad fue mayor en la raza Pastor Alemán con un 100% de positividad que las demás razas; así en los canes criollos se encontró un 76.47% de positividad a la enfermedad.

A la prueba de Chi cuadrado se determinó que NO existe asociación estadística entre la variable raza y la presencia de la enfermedad.

CUADRO 9: RELACION ENTRE LA VARIABLE RAZA Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA (omm) DE *Ehrlichia* spp. DE LOS 66 CASOS EN ESTUDIO.

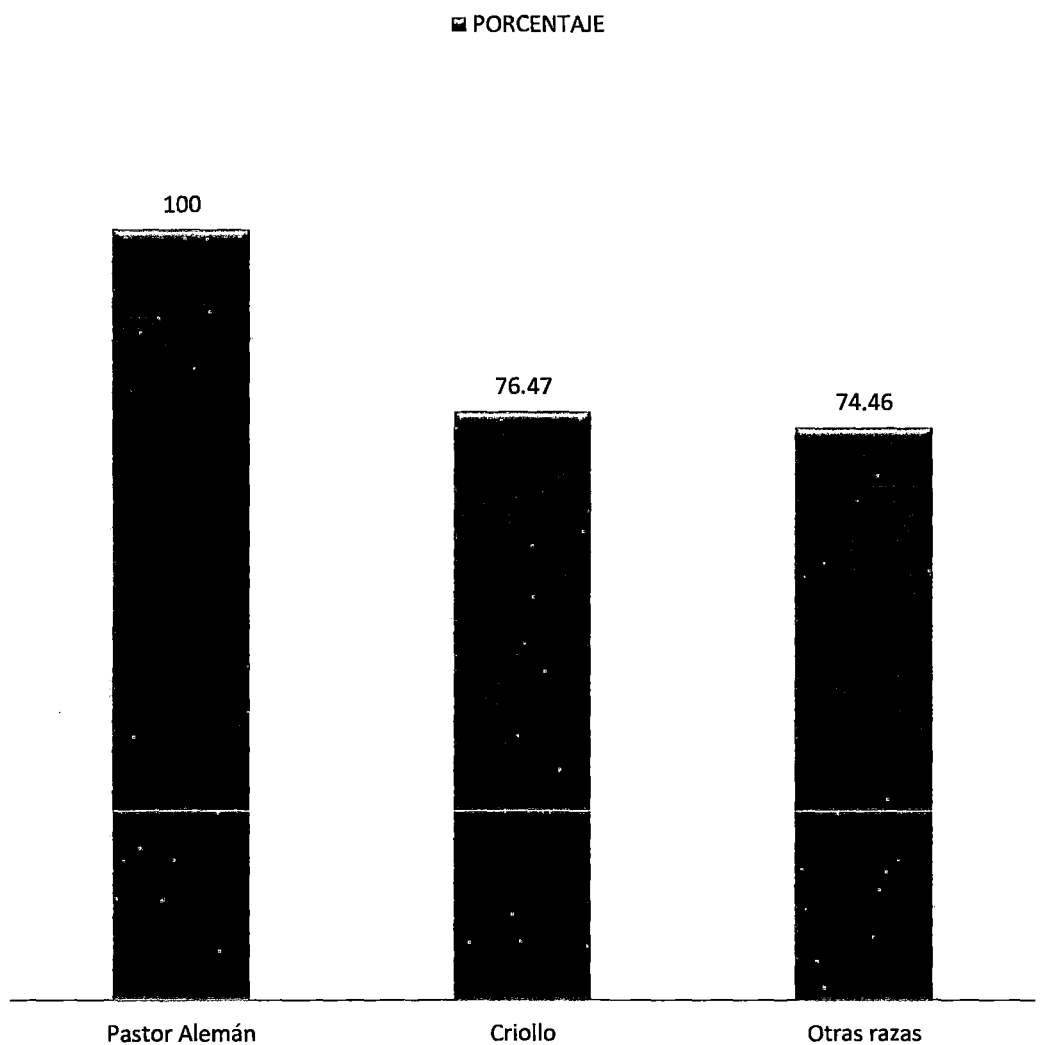
RAZA	N°	POSITIVOS	A omm
		N°	%
Pastor Alemán	2	2	100
Criollo	17	13	76.47
Otras razas	47	35	74.46
TOTAL	66	50	

$$X^2_t = 5.99$$

$$g.l. = 2$$

$$X^2_c = 0.778$$

FIGURA 13:
RELACION ENTRE LA VARIABLE RAZA Y
OBSERVACION MICROSCOPICA DE MORULA
(omm) DE *Ehrlichia spp.* DE LOS 66 CASOS EN
ESTUDIO.



4.4. PORCENTAJES EN CELULAS INFECTADAS

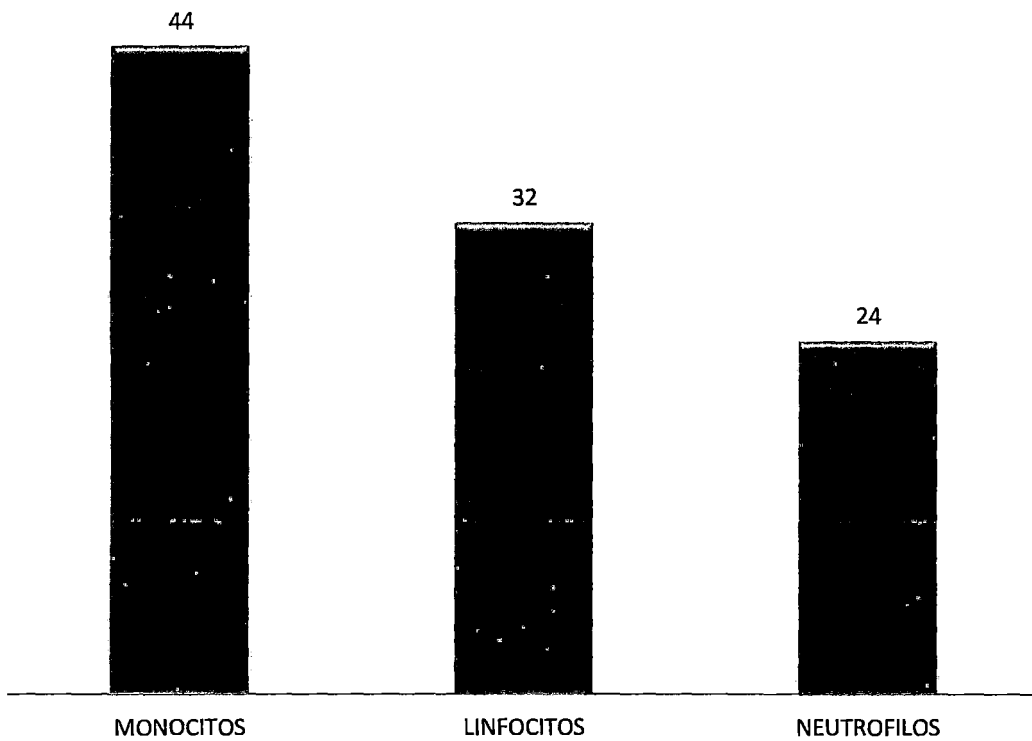
En el cuadro 10y figura 14 se muestran la células infectadas por morulas de Ehrlichia spp la cual la más comúnmente infectada son los monocitos con un 44% de positividad en contra de los neutrófilos con un 24% de células infectadas.

CUADRO 10: PORCENTAJES DE CÉLULAS INFECTADAS POR MURULAS DE *Ehrlichia spp.*

CELULA CON	N°	%
OMM		
MONOCITOS	22	44
LINFOCITOS	16	32
NEUTROFILOS	12	24
TOTAL	50	100

FIGURA 14:
PORCENTAJES DE CÉLULAS INFECTADAS POR
MURULAS DE *Ehrlichia spp.*

■ PORCENTAJE



V. DISCUSION

Terminado el proceso de investigación mediante el método estadístico de Chi cuadrado se encontraron relaciones entre el Hemograma y la observación microscópica de la mórula de *Ehrlichia canis* mediante el frotis sanguíneo. Esto demuestra que ambas pruebas son sensibles a diagnosticar la enfermedad, de tal modo que en los casos en que se muestra sintomatología clínica y/o antecedentes de garrapatas el hemograma sería una gran herramienta diagnóstica de mucha ayuda. En el caso de no encontrar síntomas compatibles y/o antecedentes de garrapatas podríamos usar otras técnicas diagnósticas rápidas como son los kits de ELISA.

Del mismo modo de los 66 casos sospechosos en estudio empleándose la observación de mórulas microscópicas de *E.canis* como diagnóstico se encontraron 50 canes positivos(75.76%) positivos a Ehrlichiosis canina; el empleo de dicho método de diagnóstico se basa en las afirmaciones de Ewing y Buckner R.G.(1965), quienes mencionan que la forma morular de *Ehrlichia canis* es fácilmente visible en el citoplasma de los leucocitos infectados, teñidos con el colorante Wright, así como Oteo y Brouqui (2005) establecen que *Ehrlichia* se aglomera en el citoplasma formando unas inclusiones que se pueden observar al microscopio óptico, denominadas mórulas, siendo encontradas estas desde una hasta tres por lamina de frotis.

La cifra encontrada (75.76%) supera ampliamente a la de Waner y Harrus (2000) quienes señalaban que solo en el 4% de los casos durante la fase aguda de la enfermedad, se puede demostrar microscópicamente la mórula intracitoplásmica de *E. canis* en los monocitos. Diferencia que puede deberse a la distinta ubicación geográfica de los estudios realizados.

En cuanto al trabajo realizado por Robles D. (2008) en 55 caninos con sintomatología clínica compatible y trombocitopenia encontrándose un 67.3% de positividad la diferencia de porcentajes de casos se debe mucho al gran incremento de la población tanto de garrapatas como de canes en la ciudad de Chiclayo.

En cuanto a la sintomatología la esplenomegalia, mucosas pálidas y petequias fueron un 98.11%, 95.23% y 90.47% positivos respectivamente a la enfermedad. Otros signos tales como anorexia, melena resultaron presentarse en un porcentaje menor que el anterior a pesar de ser considerados hallazgos comunes en los casos positivos (Neer T., 2000). Es probable que los porcentajes elevados hallados para este tipo de signología sea consecuencia del mayor número de casos compatibles con la ehrlichiosis canina en fase crónica. Los signos de esta enfermedad son inespecíficos en fase crónica así como en etapas agudas, pero las evidencias hemorrágicas (epistaxis, equimosis y petequias) y esplenomegalia acercan mucho al diagnóstico clínico de esta patología.

La reducción de las 3 líneas celulares plaquetas, eritrocitos y leucocitos ha demostrado ser estadísticamente significativo, esto indica que de los 20 animales pancitopénicos el 100% fue positivo a la observación de mórulas de *E. canis*. Esta alteración es típica de los animales en fases crónicas de ehrlichiosis canina (Sainz y col., 2000). El hallazgo de un gran número de casos con esta alteración no significa que exista una mayor cantidad de casos crónicos en los caninos de nuestro medio, sino que los animales en etapas agudas evidencian signos clínicos inespecíficos (López y col., 1999), siendo dificultoso el diagnóstico si no se cuenta con la experiencia adecuada. De esta forma los animales evidencian signos severos en las etapas avanzadas de la enfermedad, posterior a una fase subclínica (infección persistente) (Harrus y col., 1999).

El 100% de los canes pancitopénicos, fueron animales positivos a mórulas de *E. canis*, lo que nos estaría indicando que estos animales probablemente se encuentren cursando la

etapa crónica de la enfermedad (Sainz y col., 2000). El 85.71% de los casos que presentaron trombocitopenia y anemia resultaron ser positivos a la enfermedad, bicitopenia más común encontrada en los casos positivos del presente estudio. Esto es ampliamente respaldado por Greene C. (1997) quien indica que son frecuentes las asociaciones bicitopénicas en la ehrlichiosis canina, correspondiendo a cuadros agudos. Por lo tanto estos resultados indican que la pancitopenia constituye un hallazgo hematológico de importancia diagnóstica (Parnell N., 2004) seguido de la trombocitopenia y anemia (bicitopenia) en la ehrlichiosis canina.

La trombocitopenia dio una positividad del $76.92\% \pm 9.67\%$ y aunque no resultó tener significancia estadística a la prueba de chi cuadrado esto se debe a que en nuestra región Chiclayo tanto la presencia de mórulas como de trombocitopenia es alta en los animales con signos clínicos compatibles, pero alcanzan niveles superiores (65/66) en relación a la detección de mórulas (50/66) y al analizar el chi cuadrado no hay asociación entre la trombocitopenia y la detección de mórulas porque hasta los que no tienen mórula tienen trombocitopenia, lo que nos indica el poder diagnóstico de la trombocitopenia en Chiclayo. Esto la confirma como la alteración más frecuente y típica de la enfermedad, siendo esto respaldado por múltiples estudios, como el de Rodríguez-Vivas y col., (2004) de 29 animales con trombocitopenia, 26 fueron serológicamente positivos a *E. canis*. Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que de 65 animales trombocitopénicos, 50 resultaron positivos esto hace un $76.92\% \pm 9.67\%$ de positividad empleando la prueba de frotis sanguíneo resultados similares a los obtenidos por Neer T. (2000), quien indica que la trombocitopenia se da en el 82% de los casos, según diversos estudios en los Estados Unidos y confirmarían que la trombocitopenia es la alteración hematológica típica encontrada en esta infección. Algunos autores indican que la ausencia de trombocitopenia no descarta la enfermedad (Ettinger S., 1992).

La leucopenia dio una positividad del $92.3\% \pm 0.42\%$ y sí resultó ser significativa estadísticamente en los casos evaluados y es considerada una alteración reportada comúnmente en esta enfermedad (Sainz *et al.*, 2000). No coincidiendo con los estudios realizados por Robles D.(2008), Hoyos Sifuentes, (2005) y de Parnell N., 2004; Neer T., 2000. Esta reducción de los leucocitos se debe principalmente la movilización y destrucción masiva de células en circulación sanguínea, principalmente linfocitos y monocitos, las cuales son las células blanco para la *E. canis*. (Neer T., 2000).

La anemia resultó ser significativa estadísticamente teniendo una positividad de $87.75\% \pm 0.63\%$, coincidiendo con los trabajos realizados por Hoyos Sifuentes, 2005 quien encontró un $82.09\% \pm 9.18\%$ de positividad; dato respaldado por Neer T., (2000) quien indica que la anemia se presenta en el 82% de los casos con ehrlichiosis canina y esta ocasionada por supresión en la producción de los glóbulos rojos, desencadenando una anemia arregenerativa (ForrellT y Fernández, 2002; Sainz y col., 2000). La destrucción intravascular de los eritrocitos (hemólisis) por trastornos inmunomediados (Greene C., 1997) y la alteración en la disponibilidad del hierro son otras causas de suma importancia para la presentación de la anemia.

La significancia estadística encontrada en el presente trabajo para el antecedente de garrapatas en un 80.32% de positividad demuestra que la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* tiene mucha relación con la presencia de la enfermedad, siendo el único vector reconocido como transmisor de la enfermedad por *E. canis* (Groves y col., 1975).

No se encontró significancia estadística ($P < 0.05$) entre las variables sexo, edad y raza frente a la presencia de la enfermedad. Respecto a la edad, estudios anteriores indican que no existe asociación entre la edad y la presencia de la enfermedad (Matthewman y col., 1993). Nuestro estudio encontró que los canes más susceptibles de contraer la enfermedad son los mayores de 5 años, en contraste, Harrus y col., (1997b) encontraron que los

animales de edades medias son más susceptibles. Además Rodríguez-Vivas y col., (2004), determinó estadísticamente que los canes mayores a 2 años presentan asociación a padecer la enfermedad. Esto puede deberse al estado inmune, así como una mayor exposición al vector.

Así mismo ocurrió con el sexo, tanto los machos y hembras presentaron probabilidad similar a contraer la enfermedad. Esto es confirmado por la publicaciones de Neer T., (2000) y Ettinger S., (1992). Múltiples trabajos han determinado que el Pastor Alemán es más susceptible que otras razas a padecer la enfermedad, manifestando signos hemorrágicos severos (Harrus y col., 1997b; Nyindo y col., 1980). Si bien se encontró sólo 2 casos positivos a Ehrlichia de perros de raza Pastor Alemán, para el presente trabajo no se puede confirmar del todo esta susceptibilidad, debido al tipo de muestreo de casos los que llegaron de una manera aleatoria siendo indistinto para el estudio si cursaban con una etapa aguda o crónica de la enfermedad, este resultado también se puede atribuir a la patogenicidad del agente ehrlichial presente (variabilidad geográfica), o por cruces de esta raza con otras, haciéndola más resistente a la enfermedad. La diferencia radica principalmente en las vías o caminos inmunes para la eliminación del agente una vez iniciada la infección, es decir todas las razas tienen la misma probabilidad de sufrir la infección, pero no todos pueden eliminar al agente de manera exitosa.

Si a los resultados de laboratorio, anexamos los signos clínicos característicos y la exposición actual o anterior de garrapatas así como una buena respuesta al tratamiento con los antibióticos adecuados se podría realizar el diagnóstico de Ehrlichiosis canina (Paredes, J. (1994)).

Asimismo Neer T., (2000) afirma que el diagnóstico de Ehrlichiosis canina suele establecerse basándose en una combinación de signos clínicos, anormalidades hematológicas, trombocitopenias y datos serológicos.

Coincidiendo con lo establecido por Hoyos Sifuentes (2005) que menciona que los animales con signos compatibles con ehrlichiosis canina, que presenten alteraciones hematológicas típicas de la misma (trombocitopenia y/o anemia) y antecedentes de garrapatas es muy probable que curse con la enfermedad, por lo tanto recomienda el inicio de la terapia antibiótica.

Por otro lado al analizar los frotis sanguíneos encontramos más tipos celulares infestados q los típicos por *E. canis* que solo infecta monocitos y linfocitos, también se encontró un número considerable de neutrófilos infectas (14) lo que nos indicaría la probabilidad de que *E. canis* se esté especializando infectando mas células o estemos combatiendo una nueva variante de *Ehrlichia* la cual podría ser *E. chaffensis* o *E. ewingii* que si infectan neutrófilos, inclinándonos más por la primera ya que en uno de los canes se encontró una garrapata del genero *Amblyoma*(Apéndice 3) la responsable de la transmisión de la *E. chaffensis*.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El hemograma sanguíneo junto a los signos clínicos son una gran herramienta en el diagnóstico de la Ehrlichiosis canina habiendo sido comprobada con la observación de las mórulas.
- 2.- La pancitopenia, anemia-trombocitopenia y trombocitopenia son las citopenias que con más seguridad nos confirman la enfermedad.
- 3.- La sintomatología más frecuente en nuestro medio son las mucosas pálidas, petequias y esplenomegalia que juntamente con la presencia de alteraciones hematológicas y la presencia de garrapatas nos indica que es muy probable que cursen los canes con esta enfermedad.
- 4.- Estadísticamente no existe relación con las variables sexo, edad y raza con la presencia de la enfermedad.

VII. RECOMENDACIONES

1.- Controlar la población de garrapatas tanto en el perro como en el medio ambiente, principalmente parques.

2.- continuar con los estudios necesarios en esta enfermedad como prevalencias y nuevos vectores y nuevas cepas infectantes de *Ehrlichia* spp en nuestra ciudad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Bakken, J.S and Dumler, J.S. 2000 Human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis. 31:554-560
- Bellah, J.R.; Shull, R.M., and Selcer, E.V. 1986 *Ehrlichia canis* - related polyarthritis in a dog. J Am Vet Med Assoc. 189(8):922-923.
- Breitschwerdt, E.B.; Woody, B.J.; Zerbe, C.A.; De Buysscher, E.V., and Barta, O. 1987. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. J Vet Intern Med. 1(1):2-9.
- Breitschewerdt, E.B. 2003. Canine and feline ehrlichiosis: new developments. 19th Annual Congress of the ESVDECVD. Tenerife, Spain. 66-71.
- Brouqui, P. and Raoult, D. 1990. In vitro susceptibility of *Ehrlichia sennetsu* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 34(8):1593-1596.
- Buhles, W.C.Jr.; Huxsoll, D.L, and Ristic, M. 1974. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. J Infect Dis. 130:357-367.
- Carter, G.R. 1985. Bacteriología y Micología Veterinarias. Mexico: El Manual Moderno.: 280-287p.
- Chavesta, A., Viera, F. y Samamé, H. 1982. Ehrlichiosis canina en el Perú. Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Ica- Perú.
- Codner, E.C. and Farris-Smith, L.L. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J Am Vet Med Ass. 189:47-50.
- Codner, E.C. and Maslin, W. 1992. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am. J. Vet. Res. 53(3):264-269.
- Cohn L.A. 2003. Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin North Am. Small Anim Pract. 33:863-884.
- Cowell, R.L., Tyler, R.D., and Clinkenberad, K.D. 1988. Ehrlichiosis and poliartthritis in three dogs. J Am Vet Med Assoc. 192(8):1093-1095.
- Cupp, E.W. 1991. Biology of ticks: Tick-transmitted diseases. Vet Clin North Am. Small Anim Pract. 21(1):1-26.
- Davoust, B.; Parzy, D.; Ott, D., and Hasselot, N. 1991a. Ehrlichiose canine chronique: intérêt de la numération plaquettaire. Rev Méd Vét. 142:287-292.

- De Morraais, H., Hoskins, J., Pereira, N., Labarthe, N. 2004. Guidelines for diagnosis and management of dogs infected with *Ehrlichia* spp. *Clínica Veterinaria*. 48:28-30.
- Dumler, J.S., A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, J.S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of Genera in the Families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*; Unificating of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*; Description of six New Species Combinations; and Designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as Subjective Synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
- Elias, E. 1991. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *Ehrlichia canis*. *J Small Anim Pract.* 33(11):540-543.
- Eng, T.R.; Harkess, J.R., and Fishbein, D.B. 1988. 1990. Epidemiologic, clinical and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 264:2251-2258.
- Ettinger, S. J. 1992. *Tratado de Medicina Interna. Enfermedades del perro y del gato*. México: Inter.- Medica.: 297-299p.
- Frank, J.R. and Breitschwerdt, E.B. 1999. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Int Med.* 13(3):194-201.
- French, T.W. and Harvey, J.W. 1983. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am J Vet Res.* 44:2407-2411.
- Greene, C.E. and Harvey, J.W. 1984. Canine ehrlichiosis. En: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C.E. Greene (Ed). W.B. Saunders. Philadelphia . 704-709.
- Greene, C.E.; Burgdorfer, W.; Cavagnolo, R.; Philip, R.N., and Peacock, M.G. 1985. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 186(5):465-472.
- Greene, R. T. 1997. Ehrlichiosis canina: IMplicaciones clínicas de factores humorales, p. 317-320. En Kirk (ed.), *Terapéutica Veterinaria en Pequeños Animales*. 12va ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.
- Grindem, C.B.; Breitschwerdt, E.B.; Perkins, P.C.; Cullins, L.D.; Thomas, T.J., and Hegarty, B.C. 1999. Platelet associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 35(1):56-61.
- Harkess, J.R.; Ewing, S.A.; Crutcher, J.M.; Kudlac, J.; McKee, G., and Istre, G.R. 1989. Human ehrlichiosis in Oklahoma. *J Infect Dis.* 159:576-579.

- Harrus, S.; Waner, T.; Weiss, D. J.; Keysary, A., and Bark, H. 1996b. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 51(1-2):13-20.
- Harrus, S., T. Waner, and H. Bark. 1997a. Canine monocytic ehrlichiosis an update. *Comp. Cont. Ed. Prac. Vet.* 19:431-444.
- Heeb, H.L.; Wilkerson, M.J.; Chun, R., and Ganta, R.R. 2003. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 39(4):379-384.
- Hibler, S.C.; Hoskins, J.D., and Greene, C. E. 1986. Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 106-114.
- Hildebrandt, P.K; Huxsoll, D.L; Walker, J.S; Nims, R.M; Taylor, R., and Andrews, M. 1973. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). *Am J Vet Res.* 34:1309-1320.
- Hoogstraal, H. 1977. Tickborne diseases of humans: a history of environmental and epidemiological changes. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Symposium Proceedings.*
- Hoogstraal, H. 1985. *Argasid* and *Nuttalliellid* ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol.* 24:135.
- Hoskins, J.D. and Cupp, E.W. 1988. Ticks of veterinary importance: Part 1. The *Ixodidae* family: Identification, behaviour, and associated diseases. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 10:564.
- Hoyos Sifuentes, L., 2005. Evaluación del Examen Hematológico y la Técnica Indirecta de ELISA en el Diagnóstico Clínico-Laboratorial de Ehrlichiosis canina. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. Lima-Perú. 104pp.
- Huxsoll, D.L.; Hildebrandt, P.K.; Nims, R.M., and Walker, J.S. 1970. Tropical canine pancytopenia. *J Am Vet Med Ass.* 157:1627-1632.
- Kelly, P.J.; Carter, S.D.; Bobade, P.A.; Matthewman, L.A., and Bell, S.C. 1994a. Absence of antinuclear antibodies in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Rec.* 134(15):382.
- Kidd, L. and Breitschwerdt, E.B. 2003. Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compendium.* 25(10):742-751.
- Kitron, U. and Kazmierczak, J.J. 1997. Spatial analysis of the distribution of Lyme disease in Wisconsin. *Am J Epidemiol.* 145:558-566.
- Kontos, V.I. and Athanasiou, L.V. 1998. Use of enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis. *Canine Practice.* 23:10-14.

- Kuehn, N.F. and Gaunt, S.D. 1985. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc. 186(4):355-358.
- Kuttler, K.L. 1980. Pharmacotherapeutics of drugs used in treatment of anaplasmosis and babesiosis. J Am Vet Med Assoc. 176(10):1103-1108.
- Makinde, M.O. and Bobade, P.A. 1994. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. Res Vet Sci. 57(3):343-348.
- Maretzki, C.H.; Fisher, D.J., and Greene, C.E. 1994. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. J Am Vet Med Assoc. 205(11):1554-1556.
- Matthewman, L.A.; Kelly, P.J.; Brouqui, P., and Raoult, D. 1994b. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. J S Afr Vet Assoc. 65(3):104-107.
- Meinkoth, J.H.; Ewing, S.A.; Cowell, R.L.; Dawson, J.E.; Warner, C.K.; Mathew, J.S.; Bowles, M.; Thiessen, A.E.; Panciera, R.J., and Fox, C. 1998. Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. J Vet Intern Med. 12(5):389-393.
- Misao, T and Kobayashi, Y. 1955. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of patients with infectious mononucleosis using mice. Kiushu J Med Sci. 6:145-152.
- Mumaghan, M.F. and O'Rourke, F.J. 1978. Tick paralysis. In Bettini, S. (ed): Arthropod Venoms. New York: Springer-Verlag; p. 419.
- Musayón, R. 2000. Estudio Biológico de la Fase no Parasitaria de la Teleogina de *Rhipicephalus sanguineus* en la ciudad de Chiclayo. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 36pp.
- Mylonakis, M.E.; Koutinas, A.F.; Billinis, C.; Leontides, L.S.; Kontos, V.; Papadopoulos, O.; Rallis, T., and Fytianou, A. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet Microbiol. 91:197-204.
- Neer, T.M. 2000. Ehrlichiosis monocítica y granulocítica canina, p. 153-163. En C. E. Greene (ed.), Enfermedades Infecciosas en perros y gatos. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Parola, P. and Raoult, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis. 33 (5):749.
- Parnell, N. 2004. Ehrlichiosis canina, p. 1122-1124. En R. V. Morgan (ed.), Clínica de Pequeños Animales. El Sevier. España.

- Pearce, C.J.; Conrad, M.E.; Nolan, P.E.; Fishbein, D.B., and Dawson, J.E. 1988. Ehrlichiosis: a cause of bone marrow hypoplasia in humans. *Am J Hematol.* 28:53-55.
- Perterson, L.R.; Sawyer, L.A.; Fishbein, D.B.; Kelley, P.W.; Thomas, R.J.; Magnarelli, L.A.; Redus, M., and Dawson, J.E. 1989. An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserve unit exposed to ticks. *J Infect Dis.* 159:562-568.
- Popov, V.L., V.C. Han, S.M. Chen, J.S. Dumler, H.M. Feng, T.G. Andreadis, R.B. Tesh, and D.H. Walker. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.* 47:235-251.
- Prescott, L., J. Harley and D. Klein. 1999. *Microbiología. España. 4ª Ed. McGraw-Hill Interamericana.* 475-476p.
- Quiroz, H. 1984. Ixódidos. En: *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos.* 767-802.
- Rapmund, G. 1984. Rickettsial diseases for the Far East: new perspectives. *J Infect Dis.* 149:330-338.
- Reardon, M.J. and Pierce, K.R. 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis. *Vet. Pathol.* 18:48-61.
- Rikihisa, Y. 1996. *Ehrlichiae*. In "*Rickettsiae and Rickettsial Diseases*", Proceeding of the Vth International Symposium. Stara Lesna, Sept. 1-6, 1996.
- Ristic, M. 1976. Tick-borne rickettsias of veterinary importance with emphasis on the immunology of the disease. En: *Tick-Borne Diseases and Their Vectors.* Wilde, J.K.H. (Ed.). Edinburgh University Press. Edinburgh. 475-481.
- Ristic, M., Williams, J.C. and Kakoma, I. 1990. Current strategies in research on ehrlichiosis. *Ehrlichiosis.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 138-153.
- Robles, D. 2008. Diagnóstico de la Ehrlichiosis canina basada en los Hallazgos Clínico-Hematológicos de los caninos atendidos en el centro veterinario "San Martín" de la ciudad de Trujillo durante Marzo 2006 a Marzo 2007. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 72pp.
- Rohrbach, B.W.; Harkess, J.R.; Ewing, S.A.; Kudlac, J.; Mckee, G.L., and Istre, G.R. 1990. Epidemiologic and clinical characteristics of persons with serologic evidence of *E. canis* infection. *Am J Pub Health.* 80:442-445.
- Sainz, A.; Delgado, S.; Amusategui, I.; Tesouro, M.A., and Cármenes, P. 1996. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (NW Spain). *Preventive Veterinary Medicine.* 29:1-7.

- Sainz, A., Amusategui, I., Rodríguez, F., Tesouro, M.A. 2000. Las ehrlichiosis en el perro: presente y futuro.

[Http://Wcolvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm](http://Wcolvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm)

- Sainz, A.; Amusategui, I.; Kakoma, I.; Rodríguez, F., and Tesouro, M.A. Estudio sobre la presencia de anticuerpos frente a diferentes *Ehrlichia spp*, en perros de la zona centro de España. Libro De Ponencias y Comunicaciones. XXXV Congreso Nacional De AVEPA. Madrid 12-15 Octubre. 2000a.
- Sainz, A.; Tesouro, M.A., and Amusategui, I. 2000c. Prospective comparative study of three treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. J Vet Intern Med . 14(2):134-139.
- Shaw, D.H. and Rubin, S.I. 1986. Pharmacologic activity of doxycycline. J Am Vet Med Assoc.189(7):808-810.
- Troy, G.C.; Vulganot, J.C., and Turnwalt, G.H. 1980. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. J Am Anim Hosp Assoc. 16:181-187.
- Troy, G.C. and Forrester, S.D. 1990. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, and *E. risticii* infections. En: Infectious Diseases of the Dog and Cat. C.E. Greene (Ed.). W.B. Saunders. Philadelphia. 404-414.
- Vadillo, S., Píriz, S., Mateos, E. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. México.p853.
- Van Heerden, J. and Immelman, A. 1979. The use of doxycycline in the treatment of canine ehrlichiosis. J S Afr Vet Assoc.50(4):241-244.
- Waddle, J.R. and Littman, M.P. 1988. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. J Am Anim Hosp Assoc.24:615-620.
- Waner, T., Harrus, S., Weiss, D.J., Bark, H., and Keysary, A. 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet. Immunol. Inmunopathol. 48:177-182
- Weiser, M.G.; Thrall, M.A., and Fulton, R. 1991. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with cronic ehrlichiosis. J Am Anim Hosp Assoc. 27:84-88.
- Weisiger, R.M.; Ristic, M., and Huxsoll, D.L. 1975. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by indirect fluorescent antibody method. Am J Vet Res. 36(5):689-694.
- Woody, B.J and Hoskins, J.D . 1991. Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am. Small Anim Pract. 21(1):75-98.

- Yu, X.L., Zhang, X.F., Mc Bride, J.W., Zhang, Y. and Walker, D.H. 2001. Phylogenetic relationship of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia platys* to other *Ehrlichia* species determined by GroEl aminoacid sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.51:1143-1146.

IX. APENDICES

APENDICE 1: DATOS BASICOS DE TODOS LOS CANINOS EN ESTUDIO Y CELULA INFECTADAS EN LOS CANINOS POSITIVOS A OBSERVACION MICROSCOPICA DE MÓRULAS COMPATIBLES A EHRLICHIA SPP.

N°	NOMBRE	RAZA	EDAD	SEXO	FECHA	D.M.M
1	Niña	PSPP	3 años	Hembra	16/01/2014	
2	Nina	Schnauzer	13 años	Hembra	06/02/2014	monocito
3	Negra	Labrador	10 años	Hembra	17/02/2014	monocito
4	Kanata	Yorkshire	4 años	Hembra	17/02/2014	
5	Canela	Cocker	4 años	Hembra	13/03/2014	monocito
6	Dulce	Pekines	13 años	Hembra	17/03/2014	linfocito
7	Asla	Bobtail	2 años	Macho	18/03/2014	neutrofilo
8	Bratt	Shi-tzu	9 años	Macho	14/05/2014	neutrofilo
9	Apple	Cocker	6 años	Macho	21/05/2014	neutrofilo
10	Sami	Golden	5 meses	Hembra	26/05/2014	
11	Tutu	Beagle	4 años	Hembra	27/05/2014	neutrofilo
12	Rex	P. Aleman	7 años	Macho	27/05/2014	monocito
13	Stuart	Criollo	2 años	Macho	01/06/2014	monocito
14	Hachy	Criollo	4 años	Macho	09/06/2014	
15	Estevan	Labrador	1.5 años	Macho	10/06/2014	monocito
16	Juno	Labrador	2 años	Macho	14/06/2014	
17	Fonsi	Schnauzer	1 mes	Macho	30/06/2014	monocito
18	Negrita	Criollo	4 años	Hembra	02/07/2014	monocito
19	Cleo	Labrador	12 años	Hembra	04/07/2017	neutrofilo
20	Pretty	Pekines	6 años	Hembra	09/07/2014	linfocito
21	Sumba	Golden	2 años	Hembra	10/07/2014	
22	Zambo	Criollo	5 meses	Macho	10/07/2014	linfocito
23	Pele	PSPP	2 meses	Macho	11/07/2014	neutrofilo
24	Reyna	Cocker	3 años	Hembra	11/07/2014	
25	Patricio	Yorkshire	2 años	Macho	17/07/2014	linfocito
26	Doki	Shi-tzu	3 meses	Macho	19/07/2014	monocito
27	Argos	Siberiano	1 mes	Macho	31/07/2014	neutrofilo
28	Janker	Golden	2 años	Macho	31/07/2014	monocito
29	Thialu	Poodle	4 años	Hembra	04/08/2014	monocito
30	Doky	Golden	5 años	Macho	04/08/2014	
31	Braco	Criollo	4 meses	Macho	05/08/2014	monocito
32	Siery	Criollo	3 años	Hembra	06/08/2014	monocito
33	Darinka	Shi-tzu	8 años	Hembra	06/08/2014	neutrofilo
34	Chris	Criollo	5 años	Macho	12/08/2014	linfocito
35	Copito	Schnauzer	3 años	Macho	12/08/2014	

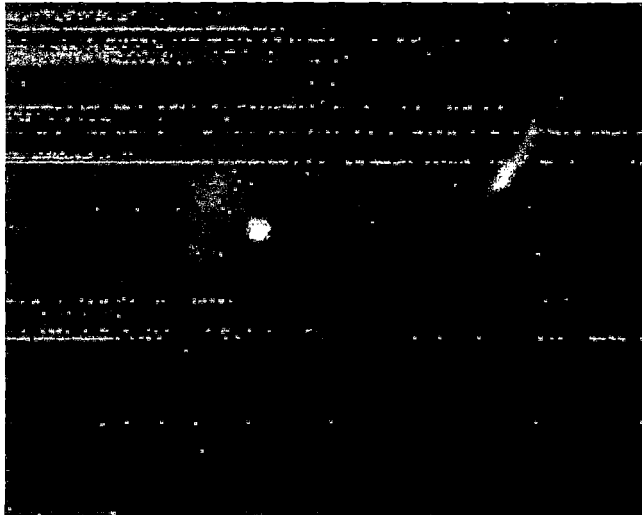
36	Rooko	Schnauzer	5 años	Macho	12/08/2014	
37	Fonsi Shanel	Schnauzer	4 meses	Macho	14/08/2014	monocito
38	Lenon	Beagle	9 años	Macho	21/08/2014	neutrofilo
39	Kaly	Poodle	12 años	Hembra	27/08/2014	linfocito
40	Mara	Labrador	12 años	Hembra	28/08/2014	
41	Winy	Criollo	5 años	Hembra	30/08/2014	linfocito
42	Luna	Siberiano	8 años	Hembra	30/08/2014	linfocito
43	Kala	Criollo	12 años	Hembra	02/09/2014	linfocito
44	Africa	Criollo	5 años	Hembra	02/09/2014	monocito
45	Dona	Schnauzer	3 años	Hembra	04/09/2014	monocito
46	Bimbo	Criollo	14 años	Macho	15/09/2014	linfocito
47	Arghos	Criollo	3 años	Macho	18/09/2014	
48	Meysi	PSPP	14 años	Hembra	22/09/2014	linfocito
49	Jayno	Cocker	1 año	Macho	22/09/2014	monocito
50	Kayser	Labrador	4 años	Macho	23/09/2014	
51	Hachy	Bulldog	4 años	Macho	24/09/2014	monocito
52	Toby	Labrador	7 meses	Macho	24/09/2014	neutrofilo
53	Mapy	Poodle	12 años	Hembra	29/09/2014	monocito
54	Brando	braco aleman	3 años	Macho	02/10/2014	linfocito
55	Fox	Cocker	2 años	Macho	03/10/2014	monocito
56	Moka	P. Aleman	7 años	Hembra	06/10/2014	linfocito
57	Browny	Labrador	12 años	Hembra	06/10/2014	
58	Julissa	Criollo	5 meses	Hembra	20/10/2014	neutrofilo
59	Manchas	Dalmata	9 años	Hembra	20/10/2014	monocito
60	Travi	Shi-tzu	8 meses	Hembra	21/10/2014	neutrofilo
61	Mafer	Golden	13 años	Hembra	26/10/2014	monocito
62	Muñeca	Criollo	4 años	Hembra	29/10/2014	linfocito
63	Scooby	Criollo	2 años	Macho	31/10/2014	linfocito
64	Croqueta	Criollo	6 años	Hembra	31/10/2014	
65	Princesa	Shi-tzu	14 años	Hembra	31/10/2014	linfocito
66	Dulce	Criollo	7 años	Hembra	31/10/2014	

APENDICE 2: RESULTADOS DEL HEMOGRAMA DE LOS CANINOS EN ESTUDIO

N°	G.R	Hb	Htc	PLAQUETA	G.B.	Segmentad	Bastonad	Eosinofi	Basofil	Monocit	Linfocito
1	4 050 000	8.67	26	182 000	26 500	10 600	1 060	2 120	0	1 590	11 130
2	4 050 000	8.67	26	180 000	5 000	3 000	400	250	0	250	11 000
3	5 450 000	11.67	35	170 000	4 000	2 880	160	320	0	120	520
4	6 350 000	13.67	41	190 000	10 200	6 222	408	612	0	510	2 448
5	3 250 000	7	21	200 000	16 750	11 725	502	670	0	837	3 015
6	2 300 000	5	15	190 000	12 100	7 865	363	484	0	484	2 904
7	5 900 000	12.67	38	160 000	8 000	4 480	320	400	0	400	2 400
8	5 350 000	11.6	35	189 000	20 850	12 093	834	1 459	0	1 042	3 336
9	4 200 000	9.6	27	195 000	8 400	6 552	168	252	0	84	1 344
10	3 750 000	8	24	205 000	5 000	3 000	100	150	0	250	1 200
11	4 925 000	10.67	32	125 000	7 250	2 683	217	145	0	580	3 988
12	3 750 000	8	24	180 000	6 200	4 092	310	372	0	186	1 240
13	4 810 000	10.3	31	146 000	9 100	5 642	364	455	0	364	2 275
14	4 500 000	9.67	29	170 000	16 000	8 480	640	800	0	480	5 600
15	3 150 000	6.6	20	180 000	5 600	4 144	280	168	0	224	784
16	6 050 000	13	39	172 000	10 300	7 313	309	412	0	515	1 046
17	2 650 000	5.6	17	192 000	34 150	19 807	4 781	2 049	341	3 073	4 098
18	5 150 000	11	33	186 000	4 950	2 921	49	198	0	297	1 485
19	4 750 000	10.3	31	156 000	14 150	9 905	283	707	0	849	1 839
20	4 200 000	9.6	27	165 000	4 250	3 315	340	170	0	85	765
21	5 250 000	12.67	38	190 000	9 100	5 642	364	455	0	364	2 275
22	6 050 000	13	39	175 000	8 000	5 600	240	480	0	160	1 520
23	5 250 000	11.3	34	175 000	14 000	9 240	560	560	0	840	2 800
24	5 600 000	12	36	170 000	8 350	5 845	250	501	0	334	1 419
25	3 500 000	7.6	23	175 000	11 250	6 187	337	450	0	225	4 050
26	4 200 000	9	27	195 000	16 650	10 656	666	666	0	499	4 162
27	4 050 000	8.6	26	189 000	17 200	9 460	1 032	1 207	0	516	4 986
28	5 150 000	11	33	157 000	9 700	3 783	388	291	0	97	5 141
29	3 750 000	8	24	200 000	9 000	6 120	360	450	0	270	1 800
30	7 650 000	16.33	49	180 000	8 500	5 100	340	340	0	170	2 550
31	4 050 000	8.67	26	190 000	6 550	4 450	393	393	0	292	1 048
32	7 650 000	16.3	49	142 000	8 400	5 040	336	168	0	84	2 772
33	4 050 000	8.67	26	200 000	6 000	438	360	300	0	60	900
34	1 250 000	3	8	144 000	4 050	2 835	324	243	0	243	405
35	7 020 000	15.03	45	189 000	4 950	2 921	49	198	0	297	1 485

36	4 350 000	9.3	28	198 000	32 950	25 371	4 613	329	0	1 318	1 318
37	2 910 000	6.36	19	189 000	17 500	10 150	1 575	1 225	0	1 050	3 500
38	4 925 000	10.67	32	167 000	6 050	3 932	242	363	0	181	1 331
39	4 600 000	10	30	190 000	5 050	3 434	101	151	0	0	1 363
40	6 500 000	14	42	195 000	9 500	5 890	475	570	0	190	2 375
41	4 910 000	9.67	29	157 000	4 050	2 351	125	162	0	250	1 458
42	4 350 000	9.33	28	140 000	10 300	7 313	309	412	0	515	1 046
43	4 810 000	10.3	31	189 000	8 400	6 552	168	252	0	84	1 344
44	4 903 000	10.7	32	192 000	50 450	35 315	4 540	2 018	0	2 018	6 558
45	4 350 000	9.33	28	170 000	6 500	4 160	260	325	0	130	1 625
46	2 400 000	5.33	16	180 000	4 000	2 280	240	160	0	120	1 200
47	6 500 000	14.1	42	200 000	9 700	6 596	485	388	0	291	1 940
48	4 350 000	9.33	28	170 000	7 500	4 650	375	375	0	225	1 875
49	3 750 000	8	24	148 000	9 200	5 336	368	552	0	184	2 760
50	6 250 000	14.7	42	190 000	7 250	2 683	217	145	0	580	3 988
51	5 900 000	12.67	38	195 000	8 600	5 332	430	430	0	258	2 150
52	3 855 000	8.4	25	200 000	8 475	7 034	84	169	0	339	848
53	6 250 000	13.3	40	189 000	7 525	5 869	376	376	0	75	828
54	6 250 000	3.33	10	198 000	9 500	5 130	285	1 045	0	950	2 290
55	2 300 000	5	15	148 000	6 800	4 420	408	272	0	204	1 496
56	4 700 000	3.33	10	145 000	9 050	7 569	696	87	0	0	348
57	4 600 000	10	30	160 000	9 800	5 978	490	392	0	196	2 744
58	2 800 000	6	18	200 000	8 900	6 052	801	267	0	445	1 335
59	3 150 000	7.6	20	170 000	6 450	4 515	387	258	0	129	1 161
60	4 500 000	9.6	29	200 000	5 700	3 135	342	171	0	57	1 995
61	3 470 000	8.1	24.9	129 000	15 560	12 450	310	0	0	930	1 870
62	3 840 000	9.2	29	128 000	7 760	5 280	0	390	0	310	1 780
63	5 500 000	12.3	36.2	70 000	8 170	5 880	570	0	0	490	1 230
64	6 670 000	15.7	40.4	122 000	10 540	5 900	210	1 050	0	840	2 530
65	5 210 000	12.4	34.5	7 000	11 080	7 200	330	220	0	1 110	2 220
66	6 310 000	14.3	48.9	129 000	9 130	5 480	0	460	0	460	2 740

APENDICE 3: GARRAPATA DEL GENERO *Amblyoma* ENCONTRADA EN UN CANINO CON EHRlichiosis CANINA



**GARRAPATA HALLADA EN CANINO
(POSIBLEMENTE *Amblyoma maculatum*)**



IMAGEN

CUADRO CLINICO EHRLICHIOSIS CANINA

FASE AGUDA (2 a 4 semanas)

Fiebre Apatía Decaimiento Anorexia Pérdida de peso. Distensión abdominal.

Linfadenomegalia Esplenomegalia Edema: extremidades escroto.

¿Presencia de garrapatas?

FASE SUBCLINICA (1 a 4 meses)

Alteraciones biopatológicas

FASE CRONICA

SINTOMAS HEMORRAGICO

Petequias: piel mucosas. Equimosis: piel mucosas. Epistaxis Melena Hematomas

Hemorragias internas. Hematuria Hipema Hemorragia retiniana. Hemoptisis

Hematemesis Hemartrosis Hemorragia cerebral.

SINTOMAS RESPIRATORIOS

Exudado nasal mucopurulento. Disnea Tos

SINTOMAS NERVIOSOS

Ataxia Síndromes de neurona motora: superior inferior.

Hiperestesia: generalizada localizada.

Síndromes convulsivos.

SINTOMAS OCULARES

Fotofobia Conjuntivitis Petequias en conjuntiva. Opacidad corneal. Uveítis anterior.

Panuveítis Hipema Retinitis difusa. Desprendimiento de retina.

Hemorragia subretiniana. Papiledema Neuritis óptica.

SINTOMAS MUSCULO ESQUELETICOS

Polimiositis Poliartritis Monoartritis Cojera

Debilidad de extremidades.

SINTOMAS RENALES

Poliuria Polidipsia Anorexia Vomito Ulceras en cavidad oral.

Insuficiencia renal (glomerulopatía inmunomediada).

SINTOMAS REPRODUCTIVOS

Hemorragias vaginales postparto. Infertilidad Abortos Mortalidad neonatal.

Hemorragias prolongadas en el proestro.

OTROS SINTOMAS:

HISTORIA CLINICA

Fecha / /

Nº:

I. DATOS DEL PACIENTE

Nombre: Especie: Raza:

Sexo: ♂ ♀ Peso: Edad:

Fecha de Nacimiento:

II. DATOS DEL PROPIETARIO

Nombre:

Dirección:

Teléfono: Celular: Correo:

Consulta nueva	Control Tratamiento	Control Quirúrgico
Diagnostico Previo (motivo de consulta)		
INTERVENCION QUIRURGICA :		
CONSTANTES FISIOLÓGICAS		
Tº:	F.C.:	F.R.:
MUCOSA Y TLLC:		
MOTIVO DE CONSULTA:	SIGNOS CLINICOS:	DIAGNOSTICO PRESUNTIVO:
		DIAGNOSTICO DEFINITIVO:
ESTUDIOS COMPLEMENTARIO:		
TRATAMIENTO:		