

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y TERAPEUTICOS DE LA EHRlichiosis
CANINA

Trabajo de Grado
(Modalidad Monografía)

AUTOR: SONIA BRAYANA INSUASTY PEREZ
COD: 200920691

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
TUNJA
2017

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS DE LA EHRlichiosis
CANINA

Trabajo de Grado
(Modalidad Monografía)

AUTOR: SONIA BRAYANA INSUASTY PEREZ
COD: 200920681

DIRECTOR: ANASTASIA CATALINA CRUZ CARRILLO

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
TUNJA
2017

NOTA DE ACEPTACION

Según el acta de sustentación No. 561 fue aprobado y calificado este trabajo de grado como sobresaliente por el programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

CARLOS EDUARDO RODRIGUEZ MOLANO
DECANO

ANGELA MIREYA RODRIGUEZ SALGADO
DIRECTORA DEL PROGRAMA

ANDRES CAYCEDO
JURADO CALIFICADOR

LUIS EUFRACIO CHAVEZ
JURADO CALIFICADOR

SONIA BRAYANA INSUASTY PEREZ
AUTOR

Tunja, 1 días del mes de septiembre de 2017

TABLA DE CONTENIDO

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
2. JUSTIFICACION.....	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. MARCO CONCEPTUAL.....	13
4.1 EHRLICHIOSIS	13
4.2 AGENTES ETIOLÓGICOS.....	13
4.3 CICLO BIOLÓGICO DE LA EHRLICHIA EN LA GARRAPATA.....	14
4.4 FACTORES PREDISONENTES A LA EHRLICHIOSIS EN EL PERRO ...	16
4.5 CICLO BIOLÓGICO DE LA <i>Ehrlichia canis</i> EN EL PERRO Y SINTOMATOLOGIA GENERADA	17
4.5.1 MECANISMOS DE ADAPTACION DE LA EHRLICHIA CANIS DENTRO DE LA CELULA HUESPED	22
4.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	24
4.7 EHRLICHIOSIS COMO ZONOSIS.....	27
4.8 PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO.....	28
4.8.1 Hemograma	29
4.8.2 Bioquímica Sanguínea	30
4.8.3 Frotis Sanguíneo	30
4.8.4 Pruebas Elisa (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas).....	34
4.8.5 Inmunofluorescencia	36
4.8.6 Reacción a la cadena de la polimerasa (PCR)	38

4.9 TRATAMIENTO.....	39
4.9.1 CONTROL DEL VECTOR	39
4.9.2 CONTROL DEL AGENTE	40
4.9.3 TRATAMIENTO DE APOYO	43
5. CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA.....	47
ANEXOS	55

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Taxonomía de la Ehrlichia canis (Chávez, 2014)	144
Ilustración 2 Rhipicephalus sanguineus a. macho; b. hembra (ESCCAP, 2010)	166
Ilustración 3 Ingreso y liberación de una Ehrlichia canis en un monocito (Chávez, 2014)	199
Ilustración 4 Ciclo biológico de la Ehrlichia canis en el perro (SA, 2015)	20
Ilustración 5 Mecanismos de adaptación de la Ehrlichia canis dentro de la célula huesped (Moumene y Meyer, 2015).....	23
Ilustración 6 Método del portaobjetos (Meyer y Harvey, 2007).....	32
Ilustración 7 Método del cubreobjetos (Meyer y Harvey, 2007).....	32
Ilustración 8 Linfocito con presencia de corpúsculos de inclusión en su citoplasma (Barrios, 2013).....	33
Ilustración 9 Suero positivo a Ehrlichia canis por inmunofluorescencia indirecta (Barrios, 2013).....	377

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Fármacos más utilizados en el tratamiento de *Ehrlichia Canis*
.....37

TABLA 2. Fármacos útiles para el tratamiento sintomático de *Ehrlichia Canis*...40

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. PAUTAS PARA EL ABORDAJE CLINICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA.....	53
--	----

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cambio climático que sufre el planeta y la capacidad adaptativa y evolutiva de los artrópodos, ha generado una re-distribución de la población de los mismos en ecosistemas donde no se encontraban de manera natural (McCown et al ,2015). En este contexto, el calentamiento global viene alterando los ecosistemas de manera constante y a veces imperceptible. El ascenso de la temperatura, los cambios en los regímenes de lluvias, las mayores precipitaciones y el aumento de las áreas inundadas, favorece la multiplicación de insectos y con ello, el cambio en la distribución de diversos vectores, lo que ha conducido a la presentación de enfermedades en zonas templadas y cálidas en el trópico alto (Barcat, 2006), aumentando el número de enfermedades emergentes, cuyos agentes etiológicos son transmitidos de manera determinante por medio de las garrapatas e insectos hematófagos (McCown et al, 2015).

Cabe resaltar que no solo el calentamiento global es la razón de la nueva distribución de los diferentes vectores, sino que existen factores mundiales tales como migración acelerada de personas, incremento en el intercambio comercial de productos, expansión de la población humana hacia áreas previamente inhabitadas, destrucción de los hábitats de animales y cambios del paisaje, modificaciones en el manejo y las tecnologías de la producción animal, desarrollo de resistencia a los antiparasitarios, ampliación de la frontera agrícola y disminución de la productividad de la tierra en países en desarrollo (Cortés , 2010).

Los microorganismos causantes de enfermedades, transmitidos por garrapatas constituyen un tema emergente de creciente interés mundial, en particular aquellos relacionados con mascotas por su estrecho contacto con las personas (López et al 2012). Dentro de estos agentes, *Ehrlichia canis*, produce una de las enfermedades infecciosas más importantes en los caninos, cuya incidencia se relaciona con las condiciones medioambientales, dentro de las que se destaca el clima y la altitud

(Benavidez y Ramirez, 2003). En Colombia, la presencia de rickettsias en diferentes especies, transmitidas por garrapatas, ha sido diagnosticada desde hace varios años y dentro de ellas, *Ehrlichia spp*, es una de las más importantes en caninos (Cartagena, et al 2015), lo que genera la necesidad de ser objeto de estudio debido a su relevancia tanto para la medicina veterinaria como para la salud pública (McCown, et al 2015).

Durante la atención médica prestada a pequeños animales en la Clínica Veterinaria es frecuente encontrar caninos con signos clínicos compatibles de Ehrlichiosis que no son patognomónicos y que se pueden confundir con los manifestados por otras patologías, tales como babesiosis, distemper, hepatitis infecciosa viral canina y leptospirosis, entre otras, dejando una amplia brecha para llegar a un diagnóstico definitivo, lo que hace necesario la ejecución de pruebas específicas, tales como los kit de prueba rápidos basados en Elisa, pruebas de inmunofluorescencia y PCR, que permitan un diagnóstico rápido y de mayor precisión de la enfermedad; basados en las afirmaciones anteriores, se concluye que se debe conocer tanto la sintomatología más relevante, como los métodos diagnósticos y el manejo terapéutico más adecuado para cada caso, lo cual permitiría evitar la pérdida de tiempo en procedimientos que no son los indicados, en ésta, que es una enfermedad que cada vez se hace más relevante en el trópico alto andino. Debido a lo anterior, se exige un conocimiento actualizado sobre la patología por parte de los médicos veterinarios, con el fin de que se logre diagnosticar, tratar y prevenir correctamente, en procura de la salud y el bienestar animal, permitiendo determinar factores del animal o del entorno, que pueden ser predisponentes y con ello establecer posibles grupos de riesgo (López, et al 1999; Cortes, 2010; Parrado et al, 2003)

2. JUSTIFICACION

La elaboración de esta monografía permitirá ofrecer a estudiantes y profesionales de medicina veterinaria y medicina veterinaria y zootecnia, un documento de enfoque médico, actualizado y útil para su constante consulta, que consolida información relacionada con las características del agente causal y su vector, la fisiopatología de la enfermedad, el abordaje semiológico que se debe hacer al paciente, las manifestaciones clínicas, el procedimiento diagnóstico integrado, esto es, los anamésicos, la evaluación clínica y las pruebas de laboratorio, así como el procedimiento terapéutico y preventivo, a nivel individual y poblacional.

Si bien existen artículos de investigación sobre la enfermedad y reportes de caso sobre aspectos específicos de la misma, así como libros de medicina interna y de enfermedades infecciosas en las que se aborda el tema desde diferentes dimensiones, la intención con esta monografía es recopilar esos aspectos específicos en un solo documento de fácil entendimiento, con información clínica aplicable al quehacer profesional, al mismo tiempo actualizada y profunda, dándole un mayor enfoque al procedimiento diagnóstico que garantice la identificación de la enfermedad y los posibles protocolos terapéuticos y profilácticos que mejoren la supervivencia de los animales afectados y disminuya la incidencia de la enfermedad, respectivamente.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar un documento científico y actualizado, con enfoque clínico sobre la ehrlichiosis canina enfatizando en los procedimientos diagnósticos (semiológicos y de laboratorio) y terapéuticos de la enfermedad

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Con el desarrollo de esta monografía se busca:

- Consolidar y unificar criterios sobre los diferentes aspectos de la enfermedad y de su agente causal.
- Recopilar información completa sobre todos los aspectos relacionados con el agente etiológico de la ehrlichiosis canina
- Ofrecer información suficiente respecto a la epidemiología de la enfermedad y a la distribución de su agente causal y vector, a nivel nacional y mundial con el fin de predecir la dinámica de la misma en concordancia con el cambio climático.
- Incluir en esta monografía un capítulo que haga referencia, con un enfoque clínico, a las manifestaciones externas y alteraciones producidas por la *Ehrlichia canis* y el porqué de éstas.
- Recopilar la información existente sobre los procedimientos y técnicas diagnósticas utilizadas en la identificación del agente etiológico y de los animales enfermos, así como el envío correcto de las muestras, buscando que los médicos puedan conducir correctamente el tratamiento

- Presentar las opciones terapéuticas con base en la literatura consultada, no solo para tratar la enfermedad, sino también para prevenirla de manera correcta y rápida en beneficio de la salud y el bienestar animal
- Lograr que esta monografía tenga un enfoque clínico que permita resaltar el impacto general de esta enfermedad en la salud de los caninos

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1 EHRLICHIOSIS

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC), también llamada, pancitopenia tropical canina, tifus canino, fiebre hemorrágica, síndrome hemorrágico, entre otros (León, et al 2008); es una enfermedad infecciosa inmunodepresora, de curso generalmente crónico, causada por bacterias Gram negativas rickettsiales intracelulares del género *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp*, las cuales son estructuras pleomórficas (cocoides - elipsoidales) con un diámetro de 0,5 µm, localizadas dentro de los leucocitos y las plaquetas, dando aspecto de mórula por las inclusiones intracitoplasmáticas (Barcat, 2006; Leal, 2014); estos microorganismos necesitan de un mamífero como reservorio y de un artrópodo (garrapatas) como vector para transmitirse, siendo las garrapatas de los géneros *Ixodes spp.* y *Rhipicephalus spp.*, las más usuales; también se pueden transmitir por medio de transfusiones sanguíneas de un animal infectado a otro susceptible o a través de fómites (Barcat, 2006; Benavidez, et al 2003; Cadavid, et al 2012; Ramsey y Tenant, 2012).

4.2 AGENTES ETIOLÓGICOS

Existen varias especies de ehrlichia que afectan a la población de mamíferos, tales como *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. risticii* reclasificada como “neorickettsia risticii”, asociada a ehrlichiosis monocítica en equinos y *Anaplasma phagocytophilum* (Barcat, 2006; Orjuela, et al 2015; Cartagena, et al 2015).

Aunque anteriormente, se pensaba que cada ehrlichia pertenecía a un hospedador específico, es decir: *E. canis*, parasita sólo a caninos y *E. chaffeensis* a venados, coyotes, cabras y seres humanos, actualmente se menciona que *E. chaffeensis*, *E.*

canis, *E. equi*, *E. ewingii* y *E. platys*, pueden manifestar enfermedades y anomalías clinicopatológicas en perros y otros animales, como lo demuestra un estudio realizado a 65 perros en Oklahoma (EEUU), donde el 15,4 % de los perros sometidos a diagnóstico por PCR, fueron positivos a *Ehrlichia sp*, de los cuales 6,2% eran positivos a *E. ewingii*, 3,1% *E. canis* y 6,2% presentaban *E. chaffeensis* (Benavidez y Ramírez, 2003; Ettinger y Feldman, 2007; Orjuela, et al 2015).

Como se mencionó en el párrafo anterior, el genogrupo Ehrlichia tiene cinco especies, de las cuales, tres se conocen por su infección en perros: *E. canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*. (Ilustración 1).

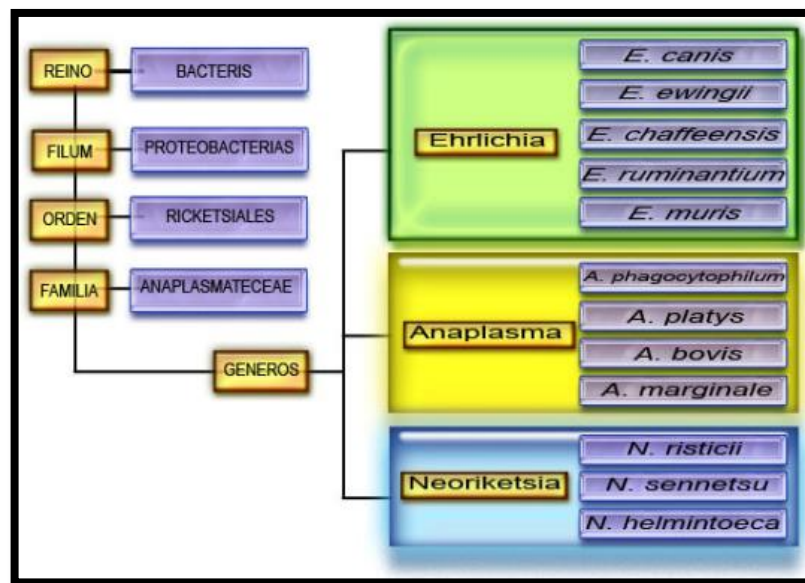


Ilustración 1 Taxonomía de la *Ehrlichia canis* (Chávez, 2014)

4.3 CICLO BIOLÓGICO DE LA EHRlichIA EN LA GARRAPATA

Como se ha mencionado, el agente causal de la enfermedad utiliza como vector a la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la cual es la más común en todo el mundo, su hospedador es el perro y se alimentan de este en todos sus estadios (Bustos,

2015); razón por la cual, para abordar el ciclo biológico de la *E. canis* se debe articular con el de la garrapata.

Las garrapatas son ácaros que presentan cabeza, tórax y abdomen fusionados, formando un cuerpo no segmentado; son considerados parásitos de los animales domésticos, silvestres y el hombre, debido a que son succionadores de sangre (Bustos, 2015). Se dividen en dos familias, Ixodidae o garrapatas duras y Argasidae o garrapatas blandas; se distinguen unas de otras en su morfología y los patógenos que transmiten (ESCCAP, 2010). El ciclo de vida comprende los estadios de adulto (hembra y macho), huevo, larva y ninfa; y su alimentación incluye varios hospedadores (Bustos, 2015).

R. sanguineus son garrapatas de color café rojizo (Ilustración 2); los adultos se alimentan de los perros, en un periodo de 6 a 50 días, aunque dependiendo de la zona donde se encuentren, se pueden alimentar de animales silvestres y hasta humanos (Bustos, 2015); copulan y el macho generalmente muere mientras la hembra cae al suelo para depositar entre 1.000 y 5.000 huevos, los cuales eclosionan de 19 a 60 días para dar lugar a las larvas, las cuales se alimentan de un perro disponible y empiezan a cambiar de forma y color para volver a caer al suelo y dar lugar a la ninfa, la cual se adhiere a otro perro; nuevamente cambia de color y forma, y cae al suelo para mudar en adultos. Este ciclo se puede completar en 63 días a 29°C, pudiéndose presentar de tres a cuatro generaciones por año (Leal, 2004; ESCCAP, 2010; Bustos, 2015).

Las garrapatas adquieren la *E. canis* al alimentarse de un perro infectado, en cualquiera de sus estadios (Leal, 2004). Una vez ingeridas, las ehrlichias pasan a faringe, esófago y llegan al intestino de la garrapata, para ser, algunas expulsadas en heces y otras quedar libres en la luz intestinal, atravesar el intestino y distribuirse por los ovarios, testículos, tubos de malpigio y glándulas salivales (Font , et al 1988),

en donde acompañadas del agua y del exceso de iones, son aprovechados para formar la saliva que será inoculada en ese u otro hospedador (Chávez, 2014); allí, durante las dos primeras semanas de comenzada la enfermedad, se multiplica en los hemocitos y células del intestino delgado de las garrapatas (Leal, 2004). La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* muerde e inyecta las secreciones de las glándulas salivales contaminadas con *E. canis*, en el perro (Cadavid, et al 2012).

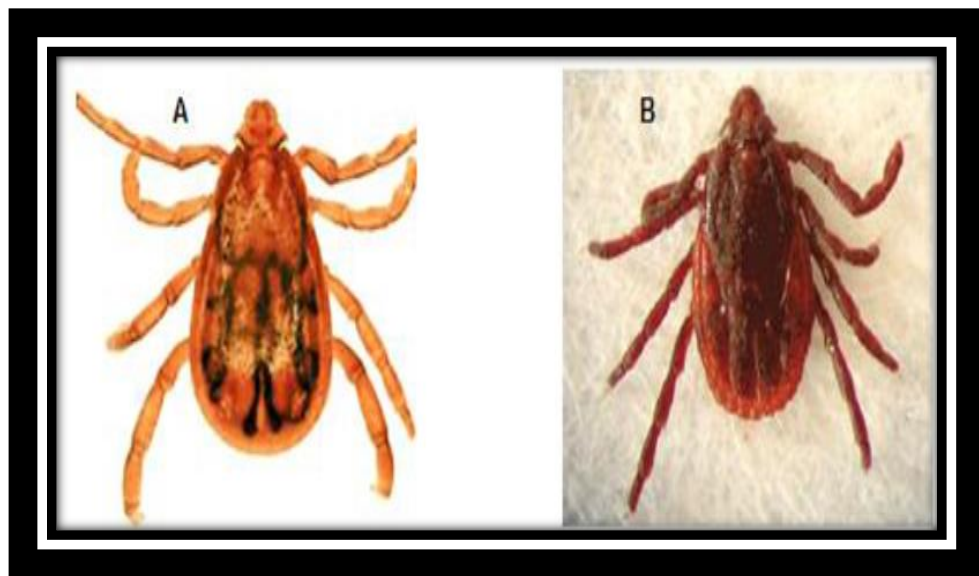


Ilustración 2 *Rhipicephalus sanguineus* a. macho; b. hembra (ESCCAP, 2010)

4.4 FACTORES PREDISPONENTES A LA EHRLICHIOSIS EN EL PERRO

Se han realizado estudios para determinar la importancia y relevancia de factores tales como, edad, sexo, raza, estado vacunal y de desparasitación, tipo de alimentación, hábitat, clima y control de garrapatas, en la presentación de la enfermedad. Por ejemplo en Florencia Caquetá, los factores de riesgo resultaron

ser, el clima cálido, favoreciendo la proliferación y persistencia de los vectores; hábitat con presencia de vectores u hospederos de vectores; deficiente control de garrapatas, perros machos, adultos, de raza pura labrador y en menor grado los criollos (Orjuela et al, 2015). En Medellín se reporta mayor seroprevalencia en hembras, lo contrario a otros estudios; coincide con una mayor presentación de la enfermedad en perros mayores a dos años, quizá por el aumento en el grado de exposición a los vectores; también resultó una mayor probabilidad de infección en los cocker spaniel ya que fue 6,4 veces más frecuente que la hallada en los bulldog francés, mientras que en los lobo siberiano, pug y labrador fue de 3,8; 5,5 y 4,1 respectivamente, más veces observado que en los bulldog (Cartagena, et al 2015); otro estudio realizado en Medellín, reporta que no hubo efecto de la raza, el sexo o la edad, en la presentación de la enfermedad (González et al, 2009). Un estudio en la Habana Cuba, en el que se analizó la seropositividad por razas, mostró al pastor alemán con la mayor frecuencia de presentación, seguido por el labrador y el cocker spaniel (León, 2008). En Villavicencio se realizó un estudio que aunque no era objetivo del trabajo se encontró que las razas mayormente afectadas son el pastor alemán (17,9%) y labrador (14.3%). Las edades oscilaron entre 7 meses a 10 años con mayor presentación de casos en pacientes con edades entre 2 y 4 años (42,8%). (Parrado et al, 2003)

4.5 CICLO BIOLÓGICO DE LA *Ehrlichia canis* EN EL PERRO Y SINTOMATOLOGÍA GENERADA

Una vez el perro es mordido por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* previamente contaminada con *E. canis*, inicia el periodo de incubación que puede ser de 7 a 21 días, tiempo durante el cual los microorganismos ingresan al torrente sanguíneo por medio de fagocitosis, se adhieren a la célula diana y entran por endocitosis, se alojan en las vacuolas citoplasmáticas derivadas de la membrana

de la célula eucariota del hospedero, allí crean un nicho para la supervivencia y reproducción; las células diana se transforman en una forma intermedia, se localizan en los macrófagos del sistema retículo-endotelial, principalmente en el sistema fagocítico mononuclear de nódulos linfáticos, bazo, hígado y médula ósea (Dolz, et al 2013; Cartagena, et al 2015), en donde empiezan a desarrollarse inicialmente como cuerpos elementales o reticulares, los cuales aumentan de tamaño, se replican por fisión binaria y se agrupan, formando los cuerpos iniciales, que continúan multiplicándose hasta formar colonias de bacterias denominadas mórulas, las cuales contienen 100 o más ehrlichias; para su difusión en el animal parasitado, la *E. canis*, una vez ha infectado las células correspondientes, es liberada por lisis celular y exocitosis (Ilustración 3); después de unos días, los cuerpos elementales se liberan de la vacuola y quedan libres fuera de la célula para iniciar un nuevo ciclo infeccioso posteriormente empieza a contaminar las otras células hasta llegar a la parasitemia (Barcat, 2006; Chávez, 2014; Cadavid, et al 2012; Gutiérrez et al, 2016), desencadenando la presentación de la enfermedad, la cual tiene tres fases fundamentales, aguda, que puede durar de dos a cuatro semanas, tiempo durante el cual la infección se disemina produciendo una primera fase de síntomas; subaguda o subclínica, que puede durar meses o hasta años, en donde el animal puede recuperarse una vez haya resolución de los síntomas o, debido a la proliferación celular de plasma y linfocitos, se puede desarrollar una tercera fase o fase crónica, la cual puede durar meses, y el animal puede desarrollar infecciones secundarias, pancitopenia, trastornos hemorrágicos, entre otros (Ilustración 4) (Cadavid, et al 2012; López, et al 2012; Leal, 2004; SA, 2015).

Es de gran importancia tener en cuenta que durante la patogénesis de la enfermedad intervienen diferentes mecanismos inmunológicos; entre los días 4 y 7 post infección, aparece IgM e IgA, y a partir del día 15, aumenta la IgG; afirmación que se debe tener en cuenta al momento de decidir qué tipo de prueba diagnóstica utilizar (SA, 2015).

Como se mencionó en el párrafo anterior, la Ehrlichiosis canina inicia con una fase aguda, la cual puede durar de dos a cuatro semanas y ser de leve a grave (Lopez, et al 2012). Las células infectadas se adhieren al endotelio vascular, produciendo vasculitis, infección del tejido subendotelial e inflamación perivascular en pulmón, riñón y meninges; también se puede desarrollar coagulación intravascular diseminada. Debido al decremento en la línea roja, se genera anemia, la cual es de tipo regenerativa, ya que se genera por el aumento de la destrucción de hematíes por mecanismos inmunológicos, por lo que también el número de leucocitos puede ser variable (López et al, 1999) ya que, puede haber tanto leucopenia como leucocitosis, aunque ésta última es menos frecuente (Chávez, 2014; Leal, 2004; SA, 2015; López, et al 1999).

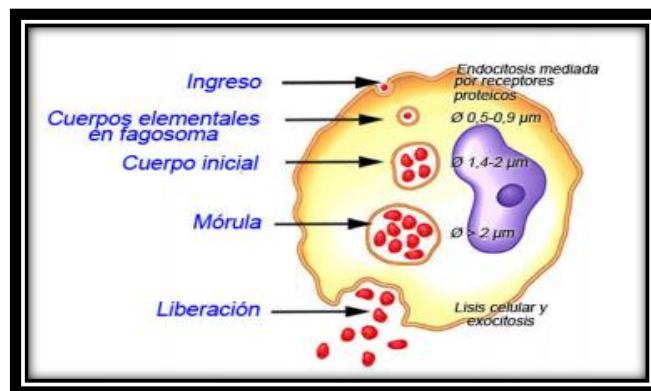


Ilustración 3 Ingreso y liberación de una *Ehrlichia canis* en un monocito (Chávez, 2014)

Se desarrolla trombocitopenia, siendo la anormalidad hematológica más común y relevante, debido a la destrucción inmunológica periférica de plaquetas y disminución en la vida media de estas células, debido a cambios en el endotelio de los vasos sanguíneos y el secuestro esplénico de trombocitos; además se reporta que en caninos que presenten ehrlichiosis, existe una citoquina sérica llamada factor de la inhibición plaquetaria (FIMP) el cual es distinto del anticuerpo antiplaquetario

e impide la migración de las plaquetas y es elaborado por los linfocitos cuando se exponen a monocitos infectados (Parrado et al , 2003); se ha demostrado que este factor inhibe la formación de pseudópodos por las plaquetas y torna a las afectadas redondas, agrupadas y permeables. Además la hiperglobulinemia tiene un efecto inhibitorio de la migración y adherencia de plaquetas circulantes (Chávez, 2014).

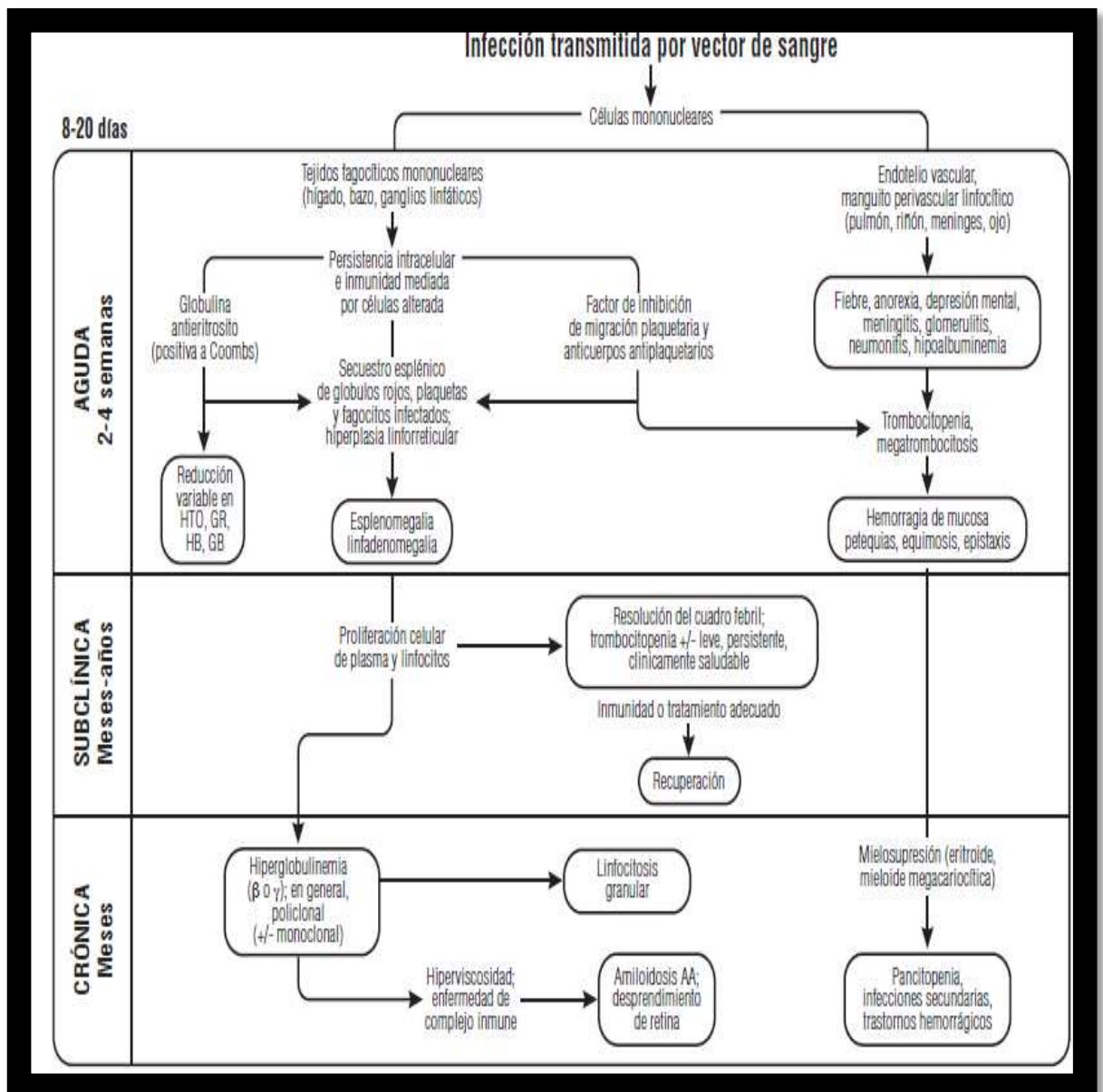


Ilustración 4 Ciclo biológico de la *Ehrlichia canis* en el perro (SA, 2015)

La sintomatología en general inicia con la presencia de garrapatas en el perro (Orjuela, et al 2015), y se caracteriza por debilidad, depresión, anorexia, pérdida de peso crónico, mucosas pálidas, fiebre, edemas (Cadavid, et al 2012), también alteraciones inespecíficas hemáticas, linfáticas, gastrointestinales, musculoesqueléticas, nerviosas, oftálmicas y renales (Cartagena, et al 2015; Hii, et al 2015). Durante la fase aguda, por lo general se presentan síntomas inespecíficos y transitorios, tales como, anorexia, petequias y equimosis. Además, linfadenopatía, secreción oculonasal, disnea, esplenomegalia, hepatomegalia, intolerancia al ejercicio debido a neumonitis y signos neurológicos causados por meningoencefalitis (Leal, 2004; Ramsey y Tennant, 2012). Se pueden presentar hemorragias, justificadas por la trombocitopenia, pero cabe destacar que muchas veces el porcentaje plaquetario es normal, lo que puede ocurrir debido a una disfunción plaquetaria por la aparición en el suero de anticuerpos antiplaquetas que se unen a los receptores glicoproteicos plaquetarios (Chavez, 2014).

La fase subaguda o subclínica, ocurre de 6 a 9 semanas post infección inicial, y dura de 1 a 4 meses. El antígeno en las células infectadas es estímulo para el sistema inmune, por lo que los títulos de anticuerpos se siguen elevando. En esta fase el animal puede eliminar el microorganismo y si no lo hace va a progresar a la fase crónica (Leal, 2004; Ettinger y Feldman, 2007). En la fase subaguda o subclínica, se agudizan más los síntomas de la primera fase, y además de la trombocitopenia hay aumento en el tamaño de las plaquetas (Leal, 2004).

Finalmente, durante la fase crónica, se deteriora la producción de elementos sanguíneos debido a hipoplasia de la médula ósea, mostrando mayor afinidad sobre la línea megacariocítica por lo que se desarrolla trombocitopenia, mencionado anteriormente (Leal, 2004). Esta fase se caracteriza por hemorragias, linfadenopatías, esplenomegalia y signos neurológicos (Benavidez et al, 2003) además de, palidez en las mucosas por la anemia, debilidad y depresión, petequias

en abdomen, edema escrotal y en las extremidades y presentación de infecciones secundarias (Leal, 2004). En esta fase la anemia observada es no regenerativa, debido a la destrucción continuada de eritrocitos, a la pérdida crónica de sangre y a la existencia de una hipoplasia o aplasia de médula ósea (Chávez, 2014). Es posible que los perros con ehrlichiosis presenten claudicaciones con andar endurecido por la poliartropatía, la cual puede ser producida por hemorragias en la articulación o por deposición de complejos inmunes con artritis como resultado y efusión neutrofílica en la articulación (SA, 2015).

Se reporta que en las fases iniciales el secuestro leucocitario por procesos inmunológicos puede dar lugar a la aparición de leucopenia, mientras que en la fase crónica podría deberse a la aplasia medular (Chávez, 2014). Los signos neurológicos son generados por las hemorragias y la inflamación de las meninges; a nivel ocular hay engrosamiento de los vasos retinianos y puede haber manchas gris oscuro en el tapetum, así como la uveítis anterior; por último se puede presentar ataxia, disfunción vestibular central o periférica, hiperestesia generalizada o localizada, además de anisocoria, disfunción cerebelar, convulsiones, poli o monoartritis que pueden ser evidenciadas en estudios radiológicos, y por último la muerte del paciente (González, et al 2009; Rojas, et al 2013; Leal, 2004).

4.5.1 MECANISMOS DE ADAPTACION DE LA EHRLICHIA CANIS DENTRO DE LA CELULA HUESPED

La *Ehrlichia Canis*, siendo una bacteria intracelular obligada, ha desarrollado varios mecanismos adaptativos, tales como adhesión, internalización, proliferación, exocitosis y propagación intercelular de *Ehrlichia spp.* utilizando diferentes vías de señalización que culminan con la adquisición de nutrientes, evasión lisosomal e inhibición de la apoptosis, procesos que aseguran la evasión de la respuesta inmune innata dentro de la célula huésped (Gutiérrez et al 2016).

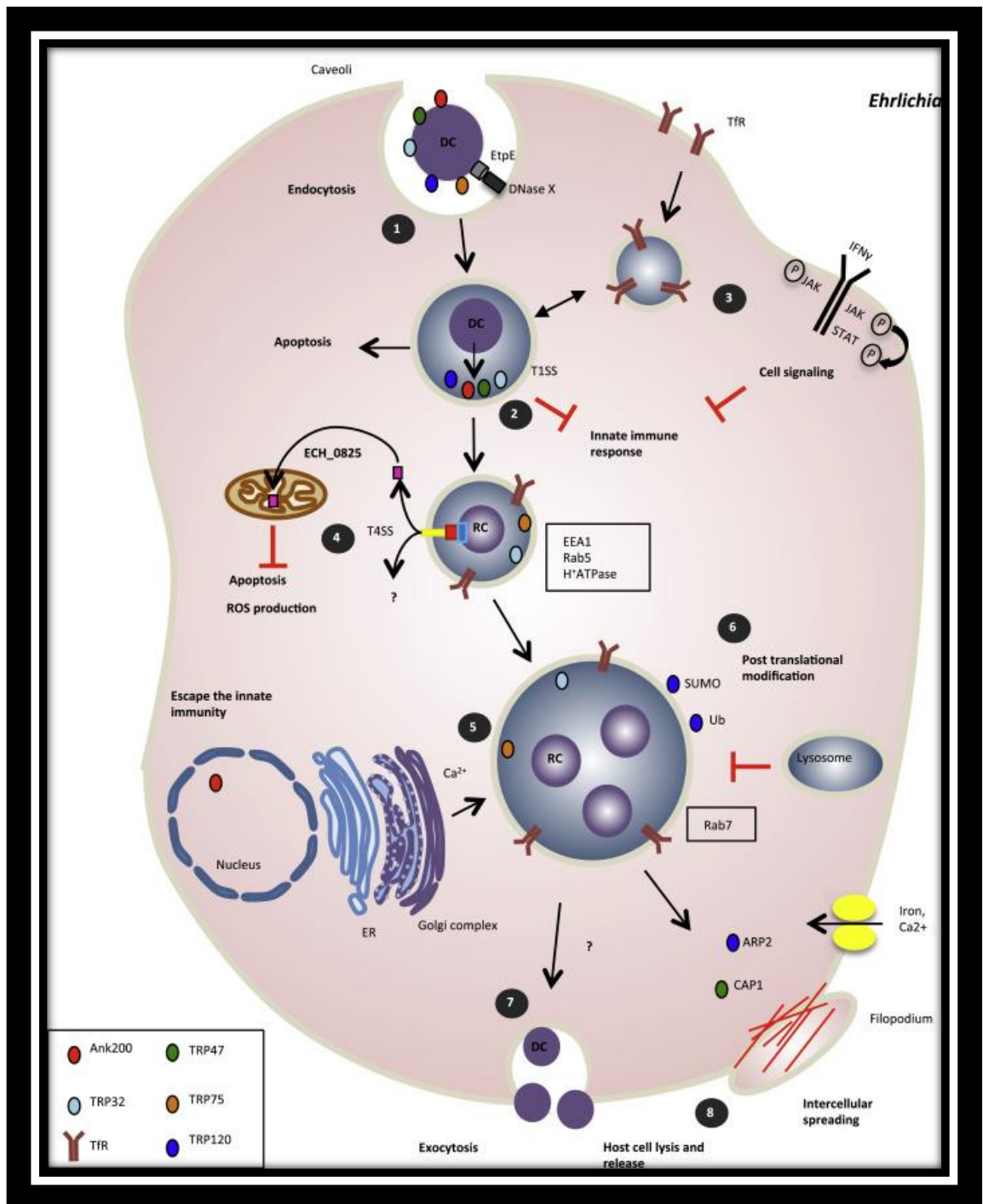


Ilustración 5. Mecanismos de adaptación de la *Ehrlichia canis* dentro de la célula huésped (Moumene y Meyer, 2015)

Estos procesos ocurren durante el ciclo biológico de la ehrlichia en la célula huésped; primero, los cuerpos elementales o células densas (CD) se unen a la

superficie de las células diana del huésped, entran por endocitosis; las bacterias se replican en una vacuola que contiene la ehrlichia, secretan la proteína T1SS la cual se une a las proteínas DNase X anclada en GPI. TRP32, TRP47, TRP120 y Ank200, para escapar de la respuesta inmune del huésped; pasa a una segunda fase, cuerpo inicial o células reticuladas (CR), las cuales se fusionan con el endosoma TFR, adquieren hierro de la célula huésped, e interrumpen las vías de señalización celular Jak y Stat, previniendo la respuesta inmune; al mismo tiempo la ehrlichia escapa vía lisosómica y secreta ECH_0825, un efector T4SS, inhibiendo la apoptosis y la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS); el cuerpo inicial se divide por fisión binaria, formando una tercera forma llamada morula, liberándose por medio de exocitosis o ruptura de la célula diana, propagándose a las células vecinas; la ehrlichia también explora vías de “sumoilación” del huésped, para mediar interacciones TRP120-huésped, y así promover la supervivencia intracelular (Ilustración 5) (Gutierrez et al, 2016; Moumene y Meyer, 2015).

4.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial; fue identificada por primera vez en perros por Donatein y Lestoquard en Argelia en 1935 y reseñada en España desde 1988 (Cadavid, et al 2012; López, 1999); fue llamada inicialmente rickettsia canis, pero luego nombrada *Ehrlichia canis* en honor al bacteriólogo Alemán Paul Ehrlich (Cadavid, et al 2012; Barcat, 2006). Empieza a extenderse hacia África del sur, Kenia y Rhodesia, hacia 1938, reportando los primeros informes de la enfermedad; para 1962, ya habían reportes en diferentes partes de África, la India, las Antillas, Estados Unidos y Sur América (Leal, 2004). Esta enfermedad se desarrolla con mayor frecuencia, en los países tropicales y subtropicales con clima cálido. En Europa, la infección canina con *E. canis*, es de presentación más frecuente en países del mediterráneo (España, Francia, Italia y Turquía) y rara vez ha habido reportes de infección en Europa Central; se considera

endémica en algunas regiones de Italia y España, mientras que un grupo de casos de la infección ha sido identificado en el norte de Francia (Potkonjak, et al 2013); también se han realizado estudios, en Alemania, donde se detectaron perros infectados con *E. Canis* en el año 1997 (Leal, 2004), En 2001, se realizó un estudio en Australia, utilizando PCR, que reporto el primer caso de *Ehrlichia platys*, la cual produce sintomatología similar a la *E. canis* y se identificó su importancia epidemiológica teniendo en cuenta que la garrapata *Rhiphicephalus sanguineus* se encuentra distribuida en varias poblaciones de Australia (Brown et al, 2001; Irwin , 2001)), en Taiwán de 344 caninos estudiados, el 9,9 % presentaron la enfermedad en un estudio realizado para el año 2012 (Orjuela, et al 2015).

En el continente americano, *Riphicepalus sanguineus* es la garrapata de mayor distribución presente en diferentes regiones, causando ehrlichiosis canina (López, et al 2012).

En México se encontró una frecuencia epidemiológica del 44,1 % en 120 caninos del hospital de Yucatán (Orjuela, et al 2015); además en Belo Horizonte, Brasil, entre 1998 a 2001, se realizó un estudio en el que se analizaron 194 historias clínicas de animales con sospecha de hemoparásitos, en el que se encontraron 31 perros con *E.canis* y 21 con *E. platys*, por medio de examen parasitológico de frotis en sangre (S.M, et al 2003). Como se mencionaba anteriormente, debido a que la ehrlichiosis es una patología frecuente en las zonas tropicales y subtropicales por la presencia del vector, en otro estudio se reportan las siguientes seroprevalencias en perros del 33,1 % en México, 16,5 % en Perú y 21,7 % en Brasil; datos que convierten la ehrlichiosis canina en una de las enfermedades más importantes de la clínica veterinaria (Adrianzen, et al 2003).

En Colombia, inicialmente se encontraba reportada la enfermedad, en zonas cálidas, de clima húmedo tropical y caliente donde se encuentran poblaciones altas de garrapatas (McCown, et al 2015), pero se ha ido difundiendo en otros pisos

térmicos de manera concordante con la presencia de los vectores (Orjuela, et al 2015; Cadavid, et al 2012), lo que genera la utilización de varias pruebas diagnósticas para identificar y confirmar la prevalencia en diferentes ciudades del país (Rojas, et al 2013).

En Florencia Caquetá, se realizó un estudio para determinar la epidemiología y factores predisponentes para la presentación de ehrlichiosis canina, en donde se obtuvo como resultado una frecuencia epidemiológica del 22,4 % (Orjuela, et al 2015). En Cartagena se reporta una prevalencia de ehrlichiosis canina, del 82%, en Medellín del 25% y para Barranquilla del 79%, resultando un promedio del 62% para las tres ciudades (McCown, et al, 2015); En 2012, confirmaron la ehrlichia, en 4 de 33 pacientes con sintomatología de ehrlichiosis canina en Medellín-Antioquia, lo que resulta el 11,2 % de presentación de la enfermedad para este estudio (Orjuela, et al 2015; Cadavid, et al 2012).

En Montería (Córdoba) se reportó la enfermedad en 20 de 74 perros sospechosos (27%), así como en Cali (Valle del Cauca) donde se encontró una seropositividad del 49,5% en 101 perros a *E. Canis* y de 31,8% para *E. chaffensis* en caninos de una zona rural de Villeta (Cundinamarca) usando la prueba de elisa; en el Valle del Cauca se realizó un estudio empleando PCR-anidada determinando la presencia del *E. canis* en todas las zonas muestreadas, presentándose zonas con alta prevalencia en los municipios de Palmira (92,8%) y Cartago (90%), prevalencia media en la ciudad de Santiago de Cali 68,75% y zonas de baja prevalencia en los municipios de Buga (30%), Ginebra (20%) y Caicedonia (10%) (Orjuela et al, 2015). En 2003 se evaluaron perros en la ciudad de Villavicencio y encontraron alta prevalencia de *Ehrlichia* spp., también en Manizales, se diagnosticó la enfermedad mediante prueba inmunoenzimática o técnica de elisa y en las ciudades de Bogotá, Bucaramanga y Villavicencio, se diagnosticó *Ehrlichia canis*, mediante técnicas de reacciones de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y PCR en 2012 (Rojas, et al 2013).

En Colombia, Corpoica realizó un estudio en 2011, sobre la distribución de *Rhipicephalus sanguineus* y otras garrapatas a nivel nacional, con el fin de identificar las tendencias de su desplazamiento para apoyar programas de manejo y control integrado de estas especies, en donde se obtuvieron modelos de áreas de distribución potencial actual y futura; los resultados para *Rhipicephalus sanguineus* explican que su distribución aumenta en las zonas de mayor altitud y además se pronostica su creciente aumento para 2020, teniendo en cuenta la contribución de las variables bioclimáticas generadas por el calentamiento global (Betancourt, 2011).

4.7 EHRLICHIOSIS COMO ZOONOSIS

La ehrlichiosis es una enfermedad inmunodepresora e infectocontagiosa, de curso agudo, subagudo y crónico, considerada como zoonosis, y con gran importancia en términos de salud pública ya que se puede transmitir de forma natural entre animales vertebrados y el hombre, teniendo en cuenta la alta prevalencia de garrapatas y su adaptación al medio por los cambios climáticos, afectando a personas de cualquier edad y sexo, debido a la estrecha relación perro, garrapata y hombre por su convivencia (Leal, 2004; León, et al 2008). Como se mencionó en párrafos anteriores, la *Ehrlichia canis*, necesita a la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* como vector, así que teniendo en cuenta que su hospedador natural es el perro, esta especie se encuentra frecuentemente cerca de las viviendas humanas por lo que se considera intradomiciliaria y puede infestar al hombre (Barrios, et al 2008).

Los primeros reportes de *E. canis* como potencial agente zoonótico datan de 1986, año en que fue descrito el primer caso de infección humana (Barrios, 2013). En 2005 se reportó el primer caso de ehrlichiosis en Costa Rica, en una niña que presentaba fiebre, manifestaciones cutáneas y neurológicas, y cuyas muestras al igual que la

de los caninos que convivían con ella, fueron enviadas al centro de control de enfermedades en Atlanta donde se determinó la presencia de *Ehrlichia spp.* (Dolz, 2013). Los primeros estudios de ehrlichiosis canina en Perú reportaron seroprevalencias de 16.5% en Lima Metropolitana y de 76% en Sullana. En América del Sur, existen evidencias serológicas de ehrlichiosis humana en Brasil (1.2%) Argentina (14.3) Chile (10.5%) y de infección por *E. canis* en Venezuela (30%) (Barrios, 2013).

4.8 PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO

El procedimiento diagnóstico empieza con la valoración clínica, la anamnesis y la evaluación del paciente al contacto con garrapatas, para posteriormente realizar pruebas de laboratorio (Benavidez y Ramírez, 2003), las cuales inician con un hemograma para determinar el estado de las células sanguíneas, además de la bioquímica sanguínea para identificar el funcionamiento de los órganos, hígado y riñón (Chávez, 2014); dependiendo de los resultados, se va a determinar la necesidad de la utilización de otras pruebas como la técnica de capa sanguínea blanca teñida con Wright o frotis sanguíneo, para identificar los corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos en linfocitos o monocitos, compatibles con *Ehrlichia spp.* (Barrios, 2013), Así mismo, se realizan pruebas directas como ELISA, la cual busca identificar anticuerpos como respuesta inmune a la exposición al antígeno, al igual que la prueba de inmunofluorescencia indirecta, con la diferencia de que esta va a reportar los títulos de anticuerpos, lo cual guiará al clínico para afirmar un diagnóstico positivo (Salazar, et al 2014). Como prueba confirmatoria se utiliza la PCR ya que identifica directamente al agente por medio de su ADN (Rojas, et al 2013; Carrillo, et al 2012).

Para entender mejor las diferentes técnicas de diagnóstico, a continuación serán definidos los siguientes términos:

- Antígeno: molécula de procedencia endógena o exógena que resulta extraña al organismo y al introducirse a este, induce una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos (Vega, 2009).
- Anticuerpo: sustancia segregada por los linfocitos como respuesta inmunitaria en la presencia de un antígeno, a fin de contribuir a su eliminación (Vega, 2009).
- Especificidad: capacidad de una técnica para diferenciar los antígenos o anticuerpos específicos buscados, de otros presentes en el material de estudio (Fernández, 2007).
- Sensibilidad: capacidad de una técnica para detectar las menores concentraciones posibles de los anticuerpos o antígenos buscados (Fernández, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación se describirán las técnicas usadas para el diagnóstico de *Ehrlichia Canis*.

4.8.1 Hemograma

El hemograma es una prueba, en la cual se analizan las diferentes células sanguíneas de forma cualitativa y cuantitativa, ofreciendo datos para confrontar con valores de referencia (Rebar, 2003). La toma de muestra se realiza extrayendo sangre de la vena cefálica anterior, y almacenándola en viales con EDTA al 10 % como anticoagulante, el tubo se llena 2/3 partes, se homogeniza invirtiendo el tubo suavemente 5-10 veces y puede ser procesada 20 minutos después de tomada la muestra, o ser refrigerada a 4°C en un lapso no mayor de 24 horas para ser enviada (León, et al 2008; Gallo, 2014). Al realizar un análisis hematológico los hallazgos

más relevantes para ehrlichiosis canina incluyen anemia no regenerativa, trombocitopenia, leucopenia y presencia de mórulas en monocitos (López, et al 2012; Hii, et al 2015, Rivera y Motta ,2013), razón por la que básicamente se tendrán en cuenta parámetros tales como hematocrito, hemoglobina, conteo total de leucocitos y conteo total de plaquetas (León, et al 2008).

4.8.2 Bioquímica Sanguínea

La bioquímica sanguínea es una prueba de sangre, que permite valorar de forma cuantitativa el funcionamiento de algunos órganos y ciertas enzimas que intervienen en los procesos homeostáticos del organismo (González, et al 2009); La muestra debe ser obtenida preferiblemente de la vena yugular o cefálica, en tubo sin anticoagulante, llenándolo 2/3 partes; debe centrifugarse a 3.000 revoluciones durante 10 minutos para la obtención del suero; puede ser enviada en refrigeración a 4°C, pero no debe sobrepasar 24 horas después de tomada la muestra para su procesamiento (Chávez, 2014). El hallazgo más frecuente en la bioquímica sanguínea en los perros con ehrlichiosis canina, es la hiperproteinemia por hiperglobulinemia, la cual frecuentemente se asocia con la presencia de hipoalbuminemia, que puede deberse, entre otros, a la existencia de proteinuria, pérdida de peso, malnutrición, hepatopatía o a un intento de compensación de la hiperproteinemia; también se han descrito en la bioquímica sanguínea elevaciones de las enzimas hepáticas , así como de la creatinina el cual podría tener un origen prerrenal (por deshidratación) o renal por glomerulonefritis o plasmocitosis intersticial renal (Chávez, 2014; Cadavid et al, 2012; González et al, 2009).

4.8.3 Frotis Sanguíneo

El frotis sanguíneo es una parte del hemograma que representa la extensión morfológica del estado de los elementos celulares de la sangre, permitiendo el estudio cualitativo de las mismas (Grispan, 1985), ya sea por cambios morfológicos, inclusiones intra o extracelular de parásitos o bacterias sanguíneas, apariencia, número y tamaño (Gallo, 2014). El procedimiento se realiza obteniendo sangre fresca y en lo posible sin anticoagulante ya que se pueden distorsionar las células (Parrado, et al 2003); se reportan dos métodos para el procedimiento, el método de portaobjetos y el método de cubreobjetos, pero hay características de cada método que ha provocado, una predilección del método del portaobjetos sobre el método de cubreobjetos (Gallo, 2014); en el método portaobjetos, una vez obtenida la muestra se toma la sangre con un capilar o aplicador, depositando una gota pequeña sobre un extremo del portaobjetos que debe estar sobre una superficie plana, se apoya el extremo de otro portaobjetos por delante de la gota y una vez este haya hecho contacto con la gota, se procede a hacer una extensión hacia adelante, con un movimiento rápido, continuo y uniforme, cubriendo 2/3 partes del otro portaobjetos (ilustración 5); Se seca rápidamente moviéndolo en el aire, nunca se debe soplar ni aplicar calor (Parrado et al, 2003; Gallo, 2014); en el método cubreobjetos, al igual que el anterior, se toma la sangre de la muestra con un capilar o aplicador, pero se va a depositar la gota de sangre en un cubreobjetos y se coloca un segundo cubreobjetos diagonalmente sobre el primero y una vez se haya extendido la sangre, se desliza el cubreobjetos de manera uniforme en dirección paralela a la superficie de contacto hasta separarlos (ilustración 6); se debe secar rápidamente moviendo en el aire (Salazar, 2014; Gallo, 2014).

Una vez realizado el frotis ya sea en el porta o cubreobjetos, se procede a su tinción, para la cual se deberán preparar los colorantes, y seguir el procedimiento específico dependiendo de cuál se vaya a utilizar, el cual incluye la fijación del frotis con metanol absoluto, se cubre o sumerge en la tinción, se juega con agua destilada y se deja secar al aire y una vez seco se procede a la observación en el microscopio (Gallo, 2014).

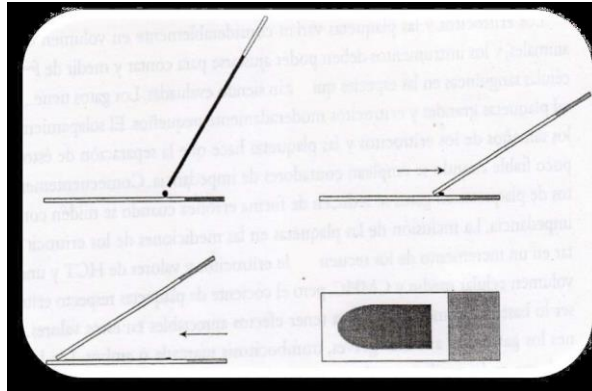


Ilustración 6 Método del portaobjetos (Meyer y Harvey, 2007)

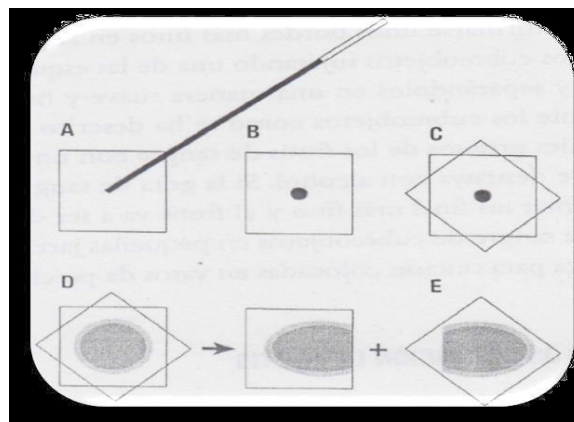


Ilustración 7 Método del cubreobjetos (Meyer y Harvey, 2007)

Cuando hay sospecha de ehrlichiosis canina, es común realizar extendidos de sangre periférica en donde se busca observar inclusiones intranucleares de apariencia morular en el citoplasma de los leucocitos compatibles a *ehrlichia spp*, tiñéndose de rojo púrpura con la tinción de Wright o de color azul con la tinción de Giemsa, durante la fase aguda de la enfermedad (Ilustración 7) (Benavidez y Ramírez, 2003; Leal, 2004; Orjuela, et al 2015).

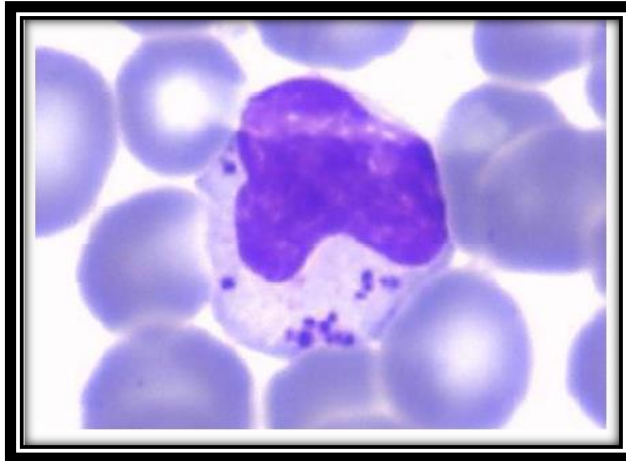


Ilustración 8 Linfocito con presencia de corpúsculos de inclusión en su citoplasma (Barrios, 2013)

El frotis sanguíneo es el método más simple, rápido y económico para detectar la bacteria, pero también es inespecífico y además el menos sensible, teniendo en cuenta que se pueden ver inclusiones no relacionadas a *Ehrlichia spp.*, no distingue especie de *ehrlichia* causando confusión y además, no detecta bajas cantidades de bacterias circulantes en sangre, ni diferencia morfología (Dolz, et al 2013); es de gran importancia tener en cuenta que un procedimiento erróneo de la técnica, tal como, una extensión demasiado gruesa o delgada, aparición de manchas sin sangre, entre otras, va a provocar alteraciones en las células, por ejemplo, la lentitud en el secado del frotis puede producir cambios morfológicos en los eritrocitos, o en el momento de la tinción, se pueden provocar deformaciones celulares o precipitaciones del colorante (Gallo, 2014; Meyer y Harvey, 2007).

La dificultad en la observación de la bacteria se debe a su muy bajo porcentaje de infección celular (menos 1%), también es de importancia tener en cuenta que las inclusiones intracitoplasmáticas solo aparecen en el 4% de los pacientes infectados (SA, 2015) lo que hace que esta prueba tenga muy baja sensibilidad, como ya se mencionó, y que su lectura sea dispendiosa, por lo que se ha conciliado que un paciente es positivo "definitivo" a la enfermedad, siempre y cuando tenga la

sintomatología clínica y los parámetros hematológicos característicos de *Ehrlichia*, sumado a títulos de IgG \geq 1:253 que se determinaran por inmunofluorescencia, prueba que será explicada más adelante (Carrillo, 2012) .

4.8.4 Pruebas Elisa (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)

Son ensayos inmunológicos que, como su nombre lo indica, utilizan una enzima como marcador para mediar la formación del complejo antígeno-anticuerpo; por lo general utilizan anticuerpos específicos como reactivos enlazantes, utilizados a nivel mundial, para la determinación de diversas sustancias biológicas, infecciosas o anticuerpos, en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar (Guzmán, 2004). Las pruebas ELISA son cualitativas, capaces de detectar anticuerpos como respuesta inmunológica del huésped, lo que indica el contacto con el patógeno, mas no que el huésped presente la enfermedad, por lo que el resultado debe relacionarse estrechamente con la condición del paciente, lo que disminuye su confiabilidad diagnóstica (Hegarty, et al 2009; McCown, et al 2015). Estas pruebas reportan sensibilidad del 79,2 % y especificidad de 100%, comparada con la inmunofluorescencia (López, 2012; Carrillo et al, 2012) y, en estudios más recientes se reporta una sensibilidad de 98,9% y especificidad igual que la anterior (Cartagena et al, 2015).

La muestra puede ser obtenida por venopunción de la vena cefálica, extrayendo de 1 a 3 ml de sangre y se procesa dependiendo el tipo de muestra que se vaya a utilizar, según lo indique el fabricante, ya sea, sangre completa, en tubo sin anticoagulante o jeringa, para su procesamiento inmediato (McCown, et al 2015); suero, el cual se recoge sin anticoagulante y se deja coagular hasta la retracción del coagulo, en posición de 30° (30 min. – 1 hora), o plasma obtenido por centrifugación de la sangre recogida con anticoagulante, aproximadamente a 3000 r.p.m. durante 10 a 15 minutos; para el almacenamiento del suero o del plasma se

recomiendan temperaturas de 4°C durante 2 o 3 días y de -20°C cuando la muestra deba conservarse por más tiempo (Gallo, 2014).

Para confirmar el diagnóstico de erlichiosis canina, se encuentran los kits de prueba rápida, los cuales están diseñados para detectar anticuerpos IgG de *Ehrlichia canis*, en pacientes infectados a partir de los 14 a 15 días pos infección (Adrianzen et al, 2003), ya que como se mencionó al principio, entre los días 4 y 7, aparece IgM e IgA, y a partir del día 15, aumenta la IgG (SA, 2015), pero se debe tener en cuenta que algunos desarrollan anticuerpos a partir del día 28 después de la infección (SA.SF; Benavidez, et al 2003; López, et al 1999; Carrillo, et al 2012). Debido a la afirmación anterior, es determinante la fase de la enfermedad en la cual se realiza la toma de la muestra, ya que se pueden presentar diagnósticos erróneos. Estos kits están basados en el principio de inmunocromatografía, la cual está comprendida de una membrana de nitrocelulosa o nylon, en donde se encuentran absorbidos en la línea de reacción, anticuerpos contra el antígeno que buscamos y sobre la línea de control, anticuerpos anticonjugado, de forma que cuando la muestra contiene el antígeno, este fluye por la membrana quedando retenido en la línea de reacción y visualizándose como un punto o línea coloreado para indicar un resultado positivo (Alonso, et al 2005; Benavidez, et al 2003; Almaso, et al 2013). Existen varios reportes acerca de la especificidad y sensibilidad de estas pruebas, por ejemplo, el snap combo Kit del laboratorio IDEXX, para la detección de Ehrlichia, identifica una región inmunodominante P30 para lo cual utiliza anticuerpos monoclonales 111H7 y reporta sensibilidad de 98.8% y una especificidad de 100% (Parrado et al, 2003); un reporte realizado en Villavicencio afirma que la prueba ELISA es un análisis confiable para obtener un diagnóstico rápido de la enfermedad y está reemplazando a la prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA), ya que no requiere de equipo especializado, de tal manera que se puede practicar en centros clínicos con la dotación del Kit (Parrado et al, 2003); pero se debe tener en cuenta la confiabilidad con la que se da un diagnóstico ya que, la prueba de

inmunofluorescencia va a reportar conteo de los anticuerpos IgG, lo que va a confirmar si el diagnóstico es positivo o si solamente hay una elevación de anticuerpos antiehrlichia por exposición al agente (Barrios, 2013).

4.8.5 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que visualiza anticuerpos sobre extensiones de muestras clínicas realizadas sobre un portaobjetos, detectando el aumento o descenso de los mismos, utilizando anticuerpos marcados con un fluorocromo o molécula fluorescente que permite detectar antígenos específicos en una sección de tejido o preparación antigénica (Alonso et al, 2005; Brown, et al 2001), puede ser directa o indirecta; en la inmunofluorescencia directa el anticuerpo empleado está marcado con una sustancia fluorescente (fluorocromos), una de las más utilizadas es la fluoresceína y en la inmunofluorescencia indirecta el anticuerpo empleado no está marcado con ninguna sustancia, revelándose la presencia del antígeno al emplear un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo frente al anticuerpo primario (Alonso et al, 2005).

La muestra de sangre completa debe ser colectada por venopunción de la vena cefálica del animal, y depositarla en tubo de ensayo sin anticoagulante; si no se va a procesar inmediatamente, congelar a -20 °C (Leal, 2004).

En el procedimiento se debe proporcionar una temperatura ambiente de 37°C al portaobjetos antes de remover el empaque de la lámina, luego colocar 10 ul de suero diluido en los pozos designados, se incuba el portaobjeto en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. Se enjuaga la laminilla en solución FA Buffer, y se elimina el exceso de líquido, para luego colocar 10 ul de Anti .IgG; se vuelve a incubar y a enjuagar, y se escurre para montar la muestra con solución de glicerol/FA y se examina con microscopio de fluorescencia a 100x -250x; en la

lámina se puede observar la reacción antígeno anticuerpo marcada por inclusiones fluorescentes, cuando es positiva, si no, no habrá reacción fluorescente (Ilustración 8) (Leal, 2004).

La técnica de inmunofluorescencia es considerada como la prueba de oro (Gold estándar), para el diagnóstico de la *Ehrlichia canis* (Carrillo et al, 2012). Esta prueba detecta la inmunoglobulina G (IgG), presentándose seroconversión en la mayoría de animales a los 28 días, considerándose como positivos a exposición por *Ehrlichia canis*, títulos $\geq 1:40$ (Salazar, et al 2014). Se debe tener en cuenta que un título alto puede ser causado si el paciente está expuesto repetidamente al patógeno, a un gran número de ehrlichias en sangre o a una mejor respuesta inmune del perro (López, 1999), además es de gran importancia tener presente que los títulos pueden persistir durante 9-12 meses después del tratamiento o la recuperación (Leal, 2004). Es una prueba altamente sensible (Leal, 2004); pero comparada con la PCR se reporta una sensibilidad de sólo el 67% (Carrillo et al, 2012).

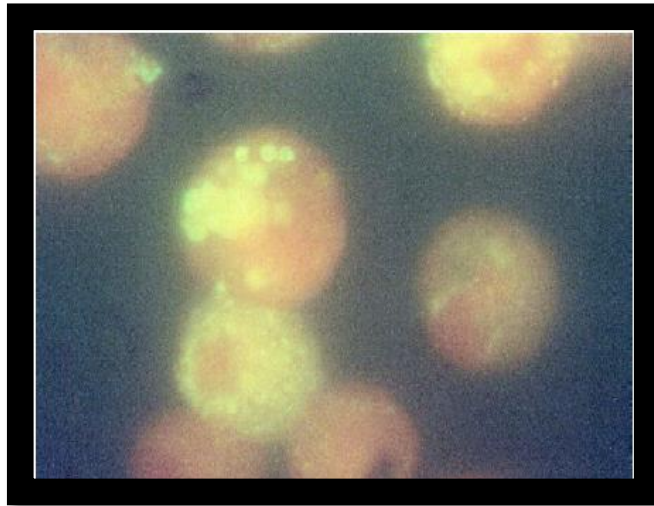


Ilustración 9 Suero positivo a *Ehrlichia canis* por inmunofluorescencia indirecta (Barrios, 2013)

4.8.6 Reacción a la cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una Reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada; los elementos importantes en la reacción son el molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay et al, 2013). Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Carrillo, et al 2012). La toma de muestra se realiza extrayendo entre 1 y 5 ml por paciente, de la vena safena, cefálica o yugular, con agujas descartables, y se almacenan en tubos o envases vacutainer con anticoagulante EDTA, y se refrigeran a 4°C hasta su procesamiento, máximo 24 horas (Rojas et al, 2013; Carrillo et al, 2012).

Se han realizado estudios para la confirmar el diagnóstico de ehrlichiosis canina por medio de PCR, específicamente PCR de tipo anidada, ya que es un método diagnóstico basado en el análisis molecular del microorganismo (reacción en cadena de la polimerasa) el cual amplifica regiones del gen 16s ARN de ehrlichia y ha demostrado alta efectividad en muestras de sangre presentando resultados más específicos, dado que no se producen reacciones cruzadas y además detecta la *Ehrlichia spp* en cualquiera de sus fases, así ya este tratada con antibioterapia (Rojas, et al 2013; Dolz et al, 2013); también se ha demostrado la utilización de líquido cefalorraquídeo para la detección de *Ehrlichia spp*. en enfermedades neurológicas caninas (Barber et al, 2010; Gutiérrez et al, 2016); existe un reporte de

caso, en el que se estudió el fluido cerebroespinal de un perro con meningoencefalitis, por medio de PCR, dirigido tanto para el ADN 16s como para el locus GP36 de *E.canis*, en el que se confirmó la enfermedad y además se demostró ventaja como diagnóstico de nueva generación que incluyen un amplio rango de cebadores para PCR y análisis de la secuencia (Kaewmongkol et al, 2016)

Debido a su alta sensibilidad, permite el diagnóstico temprano del agente, antes de que se desarrollen anticuerpos, y permite determinar el estado del portador y diferenciar entre las especies de ehrlichia (Dolz, et al 2013; Eberts, et al 2011; Lanza-Perea, et al 2014). Esta prueba puede ser usada no sólo para el diagnóstico de la enfermedad, sino también para evaluar la eliminación del patógeno después de realizada la terapia antibiótica, con lo cual puede reducirse el riesgo de reinfección del paciente o determinarse el estado del paciente como portador en la etapa subclínica de la enfermedad (Carrillo et al, 2012). También se han desarrollado ensayos para la detección del ADN de *E. canis*, por medio de la amplificación isotérmica del ADN mediada por asas (LAMP) enfocado en el operon “groESL” y visualizando los resultados en gel; la especificidad de esta prueba es confirmada por la enzima de restricción E.coRi de sitios internos en iniciadores LAMP y además no se observa ninguna reactividad cruzada (López et al, 2012).

4.9 TRATAMIENTO

El tratamiento para la ehrlichiosis canina debe integrar tanto el control del vector (garrapata) en el entorno y en el animal (Bustos, 2015), como el uso de fármacos específicos que permitan eliminar el agente causal, además de la terapia de apoyo sintomática que favorezcan la recuperación del paciente (Chávez, 2014).

4.9.1 CONTROL DEL VECTOR

- Control no químico de las garrapatas: se puede realizar por medio del manejo del hábitat, manteniendo corto el pasto y hierbas, lo que incrementa la temperatura del suelo, hay menor humedad del suelo y alta mortalidad de las garrapatas por deshidratación; también se puede hacer control biológico, utilizando hormigas que se alimentan de garrapatas o por ejemplo en EUA se han liberado avispas parasíticas del genero ixodiphagus que ataca garrapatas (Bustos, 2015).
- Control químico: en el entorno se debe manejar aplicación de insecticidas por aspersión; en la mascota realizar baños con jabones y shampos insecticidas, además de utilización de antiparasitarios externos, entre los que destacan por su eficacia, entre otros, los collares de amitraz, el fipronil y la asociación de imidacloprid con permetrina (10% y 50%, respectivamente) (Chávez, 2014).

4.9.2 CONTROL DEL AGENTE

Los fármacos más utilizados para el tratamiento de la erlichiosis canina hacen parte del grupo de las tetraciclinas, las cuales actúan uniéndose a la subunidad 30s de ribosoma, impidiendo la elongación de la cadena y alterando parcialmente la síntesis de proteínas (Ettinger y Feldman, 2007; Leal, 2004; Ramsey y Tenant, 2012), Debe tenerse en cuenta los efectos adversos , tales como, vómitos tras su administración por vía oral , además, no se deben usar en cachorros menores de 6 meses, ya que derivan afinidad por el calcio, por lo que se puede desarrollar raquitismo, malformaciones óseas, decoloración en los dientes en desarrollo y puede afectar la funcionalidad renal y /o hepática, además de que son nefrotoxicas y no deben suministrarse en pacientes con insuficiencia renal (Leal,2004; Chávez, 2014).

TABLA 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de ehrlichiosis canina (Restrepo, 2013; Plumb, 2010).

GRUPO FARMACOLOGICO	FARMACO	POSOLOGIA(mg/kg)
TETRACICLINAS	Doxiciclina	2.5 -5, C/12 h ó 10, C/24 h. por 21-28 días. VO.
	Tetraciclina	22 C/8h por 21 días ó 4-10 C/8-12 h.VO,IM,IV.
	Oxitetraciclina	20 C/8-12 h ó 7.5 -10 C/12 h. por 3-5 días.VO,IM,IV.
	Minociclina	5-12.5 C/12-24 h.VO.
FENICOLES	Cloranfenicol	15-20 C/8 h por 14 días.VO, IM, SC.
FLUORQUINOLONAS	Enrofloxacina	2.5 -5 C/12-24 h ó 5 C/24 h.VO, IM.

La doxiciclina y la minociclina son tetraciclinas que en la actualidad son de elección para el tratamiento de la ehrlichiosis canina, debido a que son más liposolubles y esto permite que haya mayor penetración en las células, excelente absorción y menor nefrotoxicidad (Ettinger y Feldman, 2007; Leal, 2004; Ramsey y Tenant, 2012).

La doxiciclina, tiene la capacidad de reestablecer la fusión de los fagosomas con los lisosomas, proceso que es inhibido por las ehrlichias (Chávez, 2014; Dolz, et al

2013; SA, 2015); también posee actividad bacteriostática, implantándose en los ribosomas de la bacteria, e inhibiendo de este modo la síntesis de proteínas. (Restrepo, 2013); la doxiciclina se absorbe en el tracto digestivo, se une a las proteínas y penetra fácilmente en los tejidos, además, es el miembro más seguro de las tetraciclinas, ya que se excreta en forma de conjugado inactivo con las heces, con lo que disminuye sus efectos negativos sobre el tracto intestinal y puede ser administrada en animales con insuficiencia renal (Chávez, 2014).

En Turquía se realizó un estudio para evaluar la eficacia de la combinación de doxiciclina- cloroquina en el tratamiento de *E. canis*, basado en que la ehrlichia induce la expresión crónica de citoquinas proinflamatorias, por lo que la cloroquina tiende a ser usual debido a su acción antiinflamatoria, antagonizando la histamina y la serotonina además de inhibir la síntesis de las prostaglandinas; resultando que con la administración de esta combinación, se disminuyeron signos clínicos y los parámetros hematológicos fueron normales (Aysul et al, 2012).

El Dipirionato de Imidocarb (imidazol) usado a dosis de 5 mg/kg vía intramuscular o subcutánea y repitiéndolo a los 14 días, resulta eficaz en perros con ehrlichiosis resistente o con infecciones mixtas por *E. canis* y *Babesia canis* (Leal, 2004); pero Ettinger y Feldman afirman que se ha detectado la falta de eficacia de los tratamientos de algunos perros con Erlichiosis (Ettinger y Feldman, 2007). Este es un fármaco de carácter ácido, por lo que puede producir dolor en el sitio de la inoculación y, en ocasiones, provoca efectos anticolinesterasa como salivación, disnea, taquicardia, temblores o diarrea que pueden revertirse mediante el empleo de atropina o glicopirrolato (Chávez, 2014).

También se reporta el uso de fenicoles, los cuales alteran parcialmente la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad 50s del ribosoma e inhibiendo la actividad de la enzima peptidiltransferasa, impidiendo la unión de aminoácidos a la síntesis de proteínas (Restrepo, 2013); el cloranfenicol es usado principalmente en los

cachorros menores de 5 meses, teniendo en cuenta las contraindicaciones de las tetraciclinas para estos pacientes, pero se afirma que no es muy utilizado en la práctica debido a los riesgos sobre la salud pública derivados del uso del cloranfenicol y además posee un efecto depresor de la médula ósea (Ramsey y Tenant, 2012; Chávez, 2014).

Dentro de los antibacterianos, también se reporta el uso de fluorquinolonas, las cuales alteran la acción de los ácidos nucleicos, inactivando la enzima ADN girasa de la bacteria e interfieren en el enrollamiento del ADN, también estimulan la topoisomerasa e inhiben la replicación del ADN (Restrepo, 2013); específicamente se usa enrofloxacin, fármaco que muestra eficacia contra rickettsias y se ha utilizado en el tratamiento de ehrlichiosis (Dofi, 2009).

4.9.3 TRATAMIENTO DE APOYO

Se requiere terapia de soporte con fluidos ya sean electrolitos o transfusión de sangre o plasma, está indicada en los animales anémicos o con hemorragias provenientes de la trombocitopenia (Ramsey y Tenant, 2012).

La normalización de las alteraciones de la analítica sanguínea suele ser más progresiva. La resolución de la trombocitopenia se suele producir en un período de 7 a 10 días tras el inicio del tratamiento y es recomendable monitorizar el valor plaquetario para evaluar la eficacia de la terapia instaurada (Dolz, 2012). En cuanto a las alteraciones del proteinograma, los valores de la albúmina y de las globulinas se suelen normalizar en 3-9 meses, aunque pueden tardar hasta 12 meses en hacerlo (López et al, 2012). El título de anticuerpos específicos frente a *Ehrlichia* spp. disminuye progresivamente tras el tratamiento eficaz y generalmente se negativiza a los 6-9 meses (Rivera y Motta, 2013), aunque algunos animales, a pesar de mejorar clínicamente, mantienen títulos elevados durante años, lo que puede indicar la permanencia del agente en el organismo, una producción de anticuerpos

persistente, una nueva infección por *E. canis* o, simplemente, una respuesta inmunitaria residual indicativa de una infección pasada. Además, se ha observado que cuando el título de anticuerpos de partida al comenzar el tratamiento es muy elevado, el tiempo necesario para su normalización o negativización es mayor que cuando se parte de un título bajo (Chávez, 2014).

TABLA 2. Fármacos útiles para el tratamiento sintomático de la ehrlichiosis canina (Restrepo, 2013; Plumb, 2010).

GRUPO FARMACOLOGICO	FARMACO	POSOLOGIA
ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS	Prednisona	1-2 C/12 h por 5 dias. VO.
	Prednisolona	1-2 C/12 h por 5 dias. VO.
ESTEROIDES ANDROGENICOS	Oximetolona	2 C/24 h. Hasta obtener resultados.VO.
	Decanoato de Nandrolona	15 C/7 dias, por dos semanas.IM.

5. CONCLUSIONES

- El calentamiento global, se ha convertido en un factor muy importante en la presentación de enfermedades, en zonas que no eran endémicas, debido a que el aumento de temperatura en las zonas frías y templadas, favorecen a la adaptación y diseminación de vectores.
- Se requiere generar investigaciones de seguimiento epidemiológico de la Ehrlichiosis Canina, tanto a nivel mundial como a nivel nacional, para determinar y evaluar planes de manejo y control de la enfermedad que consideren diferentes factores de riesgo.
- La sintomatología desarrollada en las diferentes fases de la Ehrlichiosis Canina, resulta difusa y no patognomónica, lo que conlleva a que esta enfermedad sea de difícil diagnóstico.
- El diagnóstico de la Ehrlichiosis canina, parte de los anamnesicos y el hemograma inicial, lo que genera una necesidad de utilización de pruebas específicas para la identificación de las Ehrlichias , tales como entendidos de sangre periférica, pruebas de inmunofluorescencia y PCR.
- Las pruebas ELISA, son de gran utilidad ya que no necesitan de equipos ni maquinaria, pero debe tenerse en cuenta su especificidad y sensibilidad, ya que un resultado positivo, se puede dar si el paciente tuvo contacto con el agente, y un resultado negativo, tampoco es confiable, ya que depende de la fase de la enfermedad en la que se realice la prueba.
- La prueba de inmunofluorescencia como las pruebas ELISA, son capaces de detectar los anticuerpos generados por el paciente como respuesta inmune

ante el antígeno, pero es de mayor importancia diagnóstica, los resultados arrojados en la IFA, ya que reportan los títulos de anticuerpos, para corroborar un resultado positivo.

- Los frotis sanguíneos, sirven para identificar la morfología de *Ehrlichia canis* en el citoplasma de la célula, siendo un diagnóstico definitivo, pero se debe tener en cuenta que hay dificultad en la observación de la bacteria debido a su muy bajo porcentaje de infección celular (menos 1%) y también se debe tener en cuenta que las inclusiones intracitoplasmáticas solo aparecen en el 4% de los pacientes infectados.
- La PCR puede ser usada tanto para el diagnóstico de la enfermedad, como para evaluar la eliminación del patógeno después de realizada la terapia antibiótica, con lo cual se puede reducirse el riesgo de reinfección del paciente o determinarse el estado del paciente como portador en la etapa subclínica de la enfermedad.
- El tratamiento de la Ehrlichiosis canina debe integrar tanto el control de la garrapata en el entorno como en la mascota, y además es de gran importancia la utilización del tratamiento farmacológico de elección combinado con el tratamiento sintomático según presente el animal, dependiendo de la fase en la que se encuentre.
- La Doxiciclina es el fármaco de elección para el tratamiento de Ehrlichiosis Canina, la cual actúa favoreciendo la fusión entre los fagosomas (donde se encuentra la Ehrlichia, y los lisosomas, además de poseer actividad bacteriostática; es liposoluble, por lo que se absorbe fácilmente y no es tan nefrotóxica.

BIBLIOGRAFIA

Adrianzén, J.; Chávez, A.; Casas, E.; Li, O. 2003. Seroprevalencia de la Dirofilariosis y Ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. Rev Inv Vet Perú .14 (1): 43-48

Almao, M.; García, M.; Mujica, R.. 2003. *Ehrlichia canis* en el Caserio “La Isla”, municipio Palavecino, estado Lara. Revista del colegio de médicos veterinarios del estado Lara. 1 (5)

Alonso, C.; Bartolome, R.; Dominguez, J.; Matas, L.; Rabella, N. 2005. Técnicas rápidas de detección de antígeno. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf> consultado el: 14 de septiembre de 2016

Aysul, N.; Ural, K.; Cetincaya, H.; Kuskucu, M.; Toros, G.; Eren , H.; Durum , C. 2012. Doxycycline-Chloroquine Combination for the Treatment of Canine Monocytic Ehrlichiosis. Acta scientiae veterinariae. 40 (2):1-4

Barber, RM.;Li, Diniz ; Porter, BF; Breitschwerdt, EB; Claiborne, MK; 2010. Evaluación del tejido cerebral o LCR con PCR para Ehrlichia, Anaplasma, Rickettsias del grupo de la enfermedad botonosa, Bartonella, y Borrellia en enfermedades neurológicas caninas (109 casos). Disponible en: <https://www.affinity-petcare.com/veterinary/actualidad-veterinaria/abstracts/2480>. Consultado el: 16 de agosto de 17

Barcat, J. A. 2006. El calentamiento global, las garrapatas y la Ehrlichiosis. Medicina (Buenos Aires). (66):489-491

Barrios, L.; Li, O.; Suarez, F.; Manchego, A.; Hoyos, L. 2013. Evidencia hematológica y serológica de *Ehrlichia* spp. En propietarios de caninos domesticos con antecedente de Erlichiosis en Lima Metropolitana. Rev. INVET Perú. 24 (1): 64-71

Betancourt, J.A. 2011. Modelización del efecto del cambio climático sobre la distribución de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el trópico alto Colombiano. Disponible en: http://agronet.gov.co/www/recursos_2011/documentos_cambio/doc8.pdf. Consultado el: 18 de abril de 2016

Benavidez, J.A.; Ramírez, G. F. 2003. Ehrlichiosis canina. Rev. Col Cienc Pec. 16 (3) 268-273

Brown, G.K.; Martin, A.R.; Roberts, T.K.; Aitken, R. J. 2001. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust Vet J. 79 (8) 554-558

Bustos, B.R. 2015. Identificación de las garrapatas de perros en las colonias del suroeste del municipio de Torreón, Coahuila, y su asociación con la fiebre manchada. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad autónoma agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. División de carreras agronómicas.ciudad de Torreón, Coahuila, México.

Cadavid, V.A; Franco, Y.M; Morales, L.M; 2012. Frecuencia de presentación de Erhlichiosis canina en la clínica de pequeñas especies en la Universidad de Antioquia, en el periodo comprendido entre enero a junio de 2011. Disponible en: <http://marthanellymesag.weebly.com/uploads/6/5/6/5/6565796/ehrlichiosis.pdf>. Consultado el: 05 de septiembre de 2016

Cardinot,C.; Silva, J.; Yamatogi, R.; Nunes, C.; Biondo, A. Vieira, R.; Junior, J.; Marcondes, M. 2015. Detectionn of Ehrlichia Canis, Babesia Vogeli and Toxoplasma Gondii DNA in the brain of dog naturalli infected with leishmania infantum. Journal of Parasitology. 102 (2): 275-279

Cartagena, L. M; Ríos, L. A; Cardona; J. A; 2015. Seroprevalencia de *Ehrlichia Canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. Rev. Med Vet. (29): 51.62

Carrillo L.; Betancur,S.; Roldan, D.; Perez,J.; Galeano, D.; Loaiza, E.; Giraldo, C. 2012. Implementación de un método basado en PCR para el diagnóstico de Ehrlichia spp, en caninos de Medellín, Colombia . Ces.med.vet. zotec. 7 (2)38-46

Chavez, C. 2014. Ehrlichia canis en caninos y el tratamiento con doxiciclina. Tesina para optar el título de médico veterinario .Lima-Perú

Cortes, J.A. 2010. Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 57 (1) 48- 58.

Debarbora, V. N.; Oscherou, E.B.; Gugliemone, A.A.; Nava, S.; 2011. Garrapatas asociadas a perros en diferentes ambientes en la provincia de Corrientes, Argentina. InVet. 13 (1): 45 -51

Dofi, F. 2009. Uso práctico de los antibióticos en la clínica de pequeños animales. Editorial intermedica. Buenos aires Argentina. (p. 151-152)

Dolz, G.; Ábrego, L.; Romero, L.; Campos, L.; Bouza, L.; Jiménez, A. 2013. Erhlichiosis y Anaplasmosis en Costa Rica. Acta Médica Costarricense. 55 (3):34-40

ESSCAP (Consejo Europeo para el control de las parasitosis de los animales de compañía). 2010. Ectoparásitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos. Disponible en: http://www.esccap.org/uploads/docs/22hejwfj_esguian3_ectoparasitos_altausb.pdf Consultado el 12 de abril de 2016

Ettinger, S. y Feldman, E. (2007) Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del Perro y del Gato. Sexta Edición. Elsevier Saunders, Madrid (España) p. 633-634

Eberts, M.; Vissotto, P.; Beall, M.; Stillman, B.; Chandrashekar, R.; Breitschwerdt, E. 2011. American Animal Hospital Association. 47 (6):86-94

Fernández. 2007. E.L.I.S.A Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf> consultado el 20 de febrero de 2017

Font, J.; Cairó, J.; Callés, A. 1988. Ehrlichiosis canina. Revista de AVEPA. 8 (3): 142

Gallo, C.; 2014. Manual de Diagnostico con Enfoque en Laboratorio Clínico . Trabajo de Graduación. Médico Veterinario. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. Pag. 42-118

González, M.; Caraballo, A.; Arango, J. 2009. Frecuencia de *Ehrlichia canis* y su relación con los parámetros serológicos y hematológicos en caninos en Medellín (Colombia). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 22 (3):558-559

Grispon, S. 1985. El estudio del Frotis de Sangre Periférica. Revista Medica Hondur. 53 : 282-283

Gutierrez, C.; Pérez, L.; Agrela, I. 2016. Ehrlichiosis Canina. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 28(4)641-665.

Guzman, E . 2004. Las pruebas Elisa. Gac Med Mex. 140 (3) 48-49

Hegarty, B.;Vissoto,P.;Bradley,J.; Breitschwerd,E.; 2009. Ehrlichiosis screening using SNAP 3 Dx. Journal of the American Hospital Association. 45:118-123

Hii, S.F.; Traub, R.J., Thompson, M.F.; Henning, J.; Burleigh, A.; McMahon,S.; Rees, R.L.; Koop, S.R.2015. Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne diseases in northern Australia. Australian Veterinary Journal .93 (3) :58-66

Irwin, PJ;2001. The first report of canine ehrlichiosis in Australia. Aust Vet J . 79 (8): 552-553

Kaewmongkol, P.; Maneesaay, P.; Suwannd, N.; Tiraphut, B.; Krajarng, T.; Chouybumrung,a.; Kaewmongkol, S.; Sirinarumiti,T.; Jittapatapong,S.; Fenwick,S. 2016. First detection of ehrlichia canis in cerebrospinal fluid from a nonthrombocytopenic dog with meningoencephalitis by broad-range PCR. Journal of Veterinary Internal Medicine. 30: 255-259

Leal, M. 2004. Presencia de anticuerpos contra Erlichia Canis en perros sospechosos, en el municipio de Cajeme, por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Tesis de grado. Médico Veterinario Zootecnista. Ciudad de Obregón.

León, Avelina ; Demedio, Jorge ; Márquez, Mario ; Castillo, Elio ; Perera, Anayram ; Zuaznaba, Oliever ; Caníbal, Javier; Gonzalez, Barbara ; Reynaldo, Lázaro ; Vega, Natan; Blanco, Diuris ; Ronda, Marisel ; Peña, Amelia ; Seija, Víctor. 2008. Diagnosis of canine Ehrlichiosis in Havana city. Revista electrónica de clínica veterinaria. 3 (5): 1-18

López, J.; Abarca, K.; Mundaca, M.; Caballero, C.; Valiente- Echeverría, F. 2012. Identificación molecular de Erlichia Canis en un canino de la ciudad de Arica, Chile. Revista Chilena Infectol. 29 (5): 527-530.

Lopez,j.; Castillo, A.; Muñoz,M.; Hildrebrant,S. 1999. Hallazgo de Ehrlichia canis en Chile, Informe preliminar. Arch.med.vet. 31 (2):211-214

Mason, RJ; Lee, JM; Curran, JM; Moss, A; Heide, B VanDer; Daniels, PW. 2001. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia .Aust vet J. 79 (8) 559-562

McCown, M.; Monterroso, V.; Cardona, W. 2015. Monitoreo de Erhlichia Canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, y Dirofilaria immitis en perros de tres ciudades en Colombia. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 10 (2): 224-231

Meyer, J.; Harvey, J. 2007. Medicina Laboratorial Vetrinaria: Interpretacion y Diagnosis. Multimedia Ediciones Veterinarias. Madrid. P. 320-340

Monje, C. 2011. Metodología de la investigación cuantitativa y cualitativa. Disponible en: Consultado el : 20 de abril de 2016

Orjuela, J.A; García, G. F; Imbachi, J.G; 2015. Análisis epidemiológico de la presentación de Erlichia sp. En caninos de Florencia Caquetá, Colombia. Revista Electrónica de Veterinaria. 16 (6): 1 – 10

Ozata, F.; Ural, K.; 2014. Thrombocyte índices in dogs infected whit Erhlichia Canis And Anaplasma Phagocytophilum. Rev. MVZ Córdoba. 19 (3): 4277- 4288

Parrado, M.; Vargas, F.; Hernandez, G.; Vergara, H. 2003. Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneo en caninos con sintomatología compatible a ehrlichiosis. Revista Orinoquia. 7 (1) 6-11

Plumb, D. 2010. Manual de Farmaologia Veterinaria. Intermedica. (P. 1000-1100)
Ramírez, R.; Chacín, E.; Barboza, G.; Fernández, G.; Valera, Z.; Villalobos, A.; Angulo, F. 2008. Garrapatas recolectadas de caninos bajo asistencia veterinaria en Maracaibo, Venezuela. Revista científica, FCV-Luz. 13(3): 267.270

Ramsey, L. K.; Tennant, B. J; 2012. Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales. España. Ediciones 2012. (p. 113-114)

Rebar, A. 2003. Interpretacion del Hemograma canino y felino. Clinical Handbook series. Argentina. P. (37)

Restrepo, I. 2013. Terapéutica Veterinaria. Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas. (P.111-138)

Rivera, Luis.; Motta, Pablo. 2013. Reporte de caso clínico de Ehrlichiosis equina en ell municipio de Florencia (Colombia). Revista Electrónico de Veterinaria. 14(1):1-9

Rojas, A.; Rueda, A.; Díaz, D.; Mesa, N.; Benavidez, J.; López, K.I; Álvarez, L.; López, R.. 2013. Identificación de Ehrlichia Canis (Donatien & Lestoquard) Moshkouski mediante PCR anidada. Veterinaria y Zootecnia. 7 (1): 37-48.

SA, Faggion; AR, Salvador; KL, Jacobino; LFB, Bortolotto; MB, Lopes; M, Silva; EV, Santos; AL, Fachin; SC, França; M, Marins. 2003. In: Archivos de medicina veterinaria. 45(2):197-201

SA. SF. MATERLAB. Ehrlichia Test Kit. España. Disponible en: <http://materlab.com/documentacion/VETALL/Test%20Ehrlichia%20Canis%20Kit.pdf> f consultado el 10 de septiembre de 2016

SA. 2015. MAYORSLAB.FICHA TECNICA EHRLICHIOSIS CANINA. 2015. en:<http://mayorslab.com.ar/veterinarios/wpcontent/uploads/2015/10/ehrlichiosiscanina.pdf>. Consultado el 10 de septiembre de 2016

Salazar, H.; Buritica,E.; Echeverry, D.; Barbosa, I.2014. seroprevalencia de ehrlichia canis y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de ibague (Colombia). Revista Colombiana de Ciencia Animal. 7(1):56-61

Potkonjak, A.; Savic, S.; Jurisic,A.; Petrovic,A.;Suvajdzic,L.; Lako ,B.; Milosevic, N.; Novakovic, Z.2013. Seroepidemiological Research of Canine Monocytic Ehrlichiosis in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. Acta Scientiae Veterinariae.41(1106):1-6

Starkey, L.A.; Barret, A.W.; Beall, M.J.; Chandrashekar, R.; Thatcher, B.; Tyrrell,P.; Little, S.E. 2015. Persistent Ehrlichia ewingii infection in dogs after natural tick infestation. Journal of Veterinary Internal Medicine. 29: 552-555

Tamay de Dios,L.; Ibarra ,C.; Velasquillo, C. 2013fundamentos de la reacción de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR entiendo real. Investigación en discapacidad. 2(2)70-73

Vega, Gloria. 2009. Antigenos e Inmunogenos. Rev Fa Med UNAM. 52 (1): 41

ANEXOS

ANEXO 1. PAUTAS PARA EL ABORDAJE CLINICO DE LA EHRlichiosis CANINA (Brown et al ,2001; Benavidez et al, 2003;Parrado et al,2003; Leal, 2004; Alonso et al, 2005; Ettiger y Feldman, 2007; León et al, 2008; Plumb,2010; SA, 2015; Ramsey y Tenant,2012;Lopez et al ,2012; Hii et al 2015; Rivera y Motta, 2013; Carrillo et al, 2012;barrios, 2013; Dolz et al ,2013;Tamay et al, 2013; González et al ,2013; Rojas et al 2013; Restrepo, 2013; Chavez,2014; Gallo , 2014;Cadavid et al ,2012)

	SINTOMATOLOGIA	HALLAZGOS CLINICOS	PRUEBAS DIAGNOSTICAS	TRATAMIENTO
FASE AGUDA	Anorexia , depresion , letargia, fiebre, intolerancia al ejercicio, disnea, secrecion seropurulenta de fosas nasales y sacos conjuntivales, ataxia, convulsiones.	Presencia de garrapatas,trombocitopenia leve,anemia regenerativa, petequias, hiperproteinemia, aumento de ALT, AST, Bilirrubinas y creatinina, glomerulonefritis, neumonitis, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia.	Hemograma , frotis sanguineo, Elisa(resultado positivo o negativo), PCR (resultado positivo), IFA (resultado positivo o negativo)	Tratamiento sintomatico; Tetraciclinas, fenicoles o fluorquinolonas. Tto. De eleccion. Doxiciclina a dosis de 2,5 mg/kg cada 12h. Ó 10 mg/kg, VO. cada 24 h. durante 21-28 dias. Dipirionato de imidocarb a dosis de 5 mg/kg IM, SC. Una dosis y repetir a los 14 dias.
FASE SUBAGUDA	Incrementan los sintomas de la fase aguda, pueden haber hemorragias.	Igual a la fase aguda. La trombocitopenia se vuelve moderada.	Hemograma , frotis sanguineo, Elisa(resultado positivo o negativo), PCR (resultado positivo), IFA (resultado positivo)	Igual a la fase aguda.Terapia de soporte ya sean electrolitos, transfusion de sangre. Antiinflamatorios esteroides; esteroides androgenicos. (revisar Tabla 1 y Tabla 2)
FASE CRONICA	Los mismos que en las fases anteriores. Claudicaciones, hemorragias, uveitis, hiperestesia generalizada o ocalizada, anisocoria.	Igual a las anteriores fases. Trombocitopenia grave, anemia no regenerativa, infecciones secundarias, edemas, poli o monoartritis.	Hemograma , frotis sanguineo, Elisa(resultado negativo), PCR (resultado positivo), IFA (resultado positivo o negativo)	Igual que las fases anteriores.Terapia de soporte ya sean electrolitos, transfusion de sangre. Antiinflamatorios esteroides; esteroides androgenicos. (revisar Tabla 1 y Tabla 2)

