



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
Carrera MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TÍTULO:  
DETERMINACIÓN DE *Erhlichia spp.* MEDIANTE EL MÉTODO DE  
FROTIS PERIFÉRICO DIRECTO USANDO TINCIÓN DE GIEMSA  
EN PERROS**

**AUTOR:**

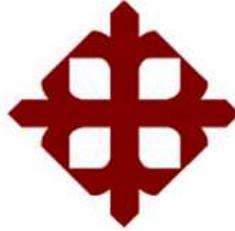
**MORALES ROMO-LEROUX GUSTAVO FRANCISCO**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DE  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**TUTOR:**

**ANDRADE ORTÍZ ANÍBAL**

**Guayaquil, Ecuador  
2014**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

## **CERTIFICACIÓN**

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por Gustavo Francisco Morales Romo-Leroux, como requerimiento parcial para la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista.

### **TUTOR**

**Dr. Aníbal Andrade Ortiz**

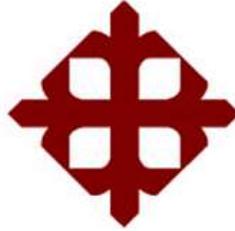
---

### **DIRECTOR DE LA CARRERA**

**Ing. John Eloy Franco Rodríguez, Msc.**

---

**Guayaquil, a los 30 del mes de septiembre del año 2014**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **Gustavo Francisco Morales Romo-Leroux**

### **DECLARO QUE:**

El Trabajo de Titulación: **DETERMINACIÓN DE *Erhlichia spp.* MEDIANTE EL MÉTODO DE FROTIS PERIFÉRICO DIRECTO USANDO TINCIÓN DE GIEMSA EN PERROS** previa a la obtención del Título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

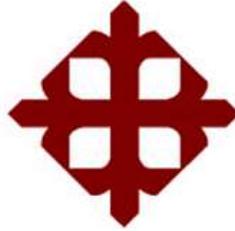
En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del Trabajo de Titulación referido.

**Guayaquil, a los 30 del mes de septiembre del año 2014**

**EL AUTOR**

---

**Gustavo Francisco Morales Romo-Leroux**



UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## AUTORIZACIÓN

Yo, **Gustavo Francisco Morales Romo-Leroux**

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, la **publicación** en la biblioteca de la institución del Trabajo de Titulación: **DETERMINACIÓN DE *Erhlichia spp.* MEDIANTE EL MÉTODO DE FROTIS PERIFÉRICO DIRECTO USANDO TINCIÓN DE GIEMSA EN PERROS**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

**Guayaquil, a los 30 del mes de septiembre del año 2014**

**EL AUTOR:**

---

**Gustavo Francisco Morales Romo-Leroux**

## **AGRADECIMIENTO**

A mi Madre, la Dra. Ketty RomoLeroux, por dedicar tiempo y esfuerzo para ser de mi un hombre de bien y darme excelentes consejos en mi caminar diario. De todo corazón aquella mujer muy especial, mi esposa, Abg. Jimena Falcones, que con su entrega ha sido una persona incondicional, mi amiga y madre de mi hija.

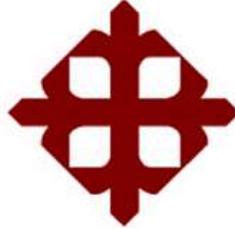
A la universidad Católica de Santiago de Guayaquil, a sus autoridades, docentes y personal administrativo, por abrir sus puertas y darme la confianza necesaria para triunfar en la vida y transmitir sabiduría para mi formación profesional.

**GUSTAVO FRANCISCO MORALES ROMO-LEROUX**

**DEDICATORIA**

**A MI HIJA**

**GUSTAVO FRANCISCO MORALES ROMO-LEROUX**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CALIFICACIÓN**

---

**Dr. ANÍBAL ANDRADE ORTIZ**  
**PROFESOR TUTOR**

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pág.
<b>AGRADECIMIENTO</b>	
<b>DEDICATORIA</b>	
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes.	2
1.2. Planteamiento del problema.	3
1.3. Justificación.	4
1.4. Objetivos.	5
1.4.1. Objetivo general.	5
1.4.2. Objetivos específicos.	5
1.5. Preguntas de Investigación.	5
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1. <i>Ehrlichia canis</i> : Taxonomía y Nomenclatura.	6
2.2. Distribución histórica y geográfica en América.	7
2.2.1. Ehrlichiosis en América Latina.	8
2.2.1.1. República Bolivariana de Venezuela.	8
2.2.1.2. Chile.	8
2.2.1.3. Perú.	8
2.2.1.4. Brasil.	8
2.2.1.5. Ecuador.	9
2.3. Especies de <i>Ehrlichia</i> que infectan cánidos.	9
2.3.1. <i>Ehrlichia ewingii</i>	9

2.3.2. <i>Ehrlichia spp.</i>	10
2.4. Descripción de la <i>Ehrlichia cannis</i> – <i>Ehrlichiosis monocítica Canina</i> .	
2.4.1. Fisiopatología.	10
2.4.1.1. Patogénesis.	10
2.4.1.2. Desde la inoculación hasta la fase aguda.	11
2.4.1.3. Fase sub-clínica.	12
2.4.1.4. Fase crónica.	13
2.5. <i>Ehrlichia spp.</i> versus Respuesta Inmune.	14
2.5.1. Respuesta inmune no específica: Inmunidad adquirida.	15
2.5.2. Respuesta inmune específica: Inmunidad innata.	16
2.5.3. Inmunidad Celular.	16
2.5.4. Inmunidad Humoral.	17
2.6. Agente vector: Garrapata marrón del perro.	17
2.6.1. Taxonomía: Clase <i>Arachnida</i> – Sub-clase <i>acari</i> .	18
2.6.2. Género <i>Rhipicephalus</i> : Características Morfofisiológicas.	18
2.6.3. Distribución de la enfermedad.	19
2.6.4. Ciclo de vida: <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	19
2.7. Diagnóstico.	20
2.7.1. Diagnóstico Clínico.	20
2.7.2. Signos multisistémicos.	20
2.7.3. Signos Oculares.	21
2.7.4. Signos neuromusculares.	21
2.7.5. Infecciones secundarias concurrentes.	21
2.7.6. Diagnóstico de Laboratorio.	22
2.7.7. Métodos directos.	23
2.7.8.- Alteraciones Hematológicas.	23

2.8. Frote Periférico.	24
2.8.1. Tinción de Giemsa.	24
2.8.2. Tinción de Wrigth.	25
2.8.3.- Alteraciones en la Orina.	26
2.8.4.- Métodos Indirectos.	26
2.8.5.- Método de Inmunoabsorción Ligada de Enzimas	26
2.8.6.- Método de Western Immunoblot.	27
2.8.7.- Diagnóstico molecular.	27
2.8.8.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	28
<b>3. MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>29</b>
3.1. Detalle de las metodologías.	29
3.1.1.- Diseño metodológico.	29
3.1.2.- Tipo de investigación.	29
3.2. Variables a evaluar.	30
3.3. Análisis estadístico.	34
3.4. Ubicación del ensayo.	34
3.5. Características climáticas.	34
3.6. Materiales	35
3.6.1. Materiales de campo.	35
3.6.1.1. Biológicos.	35
3.6.1.2. Físicos.	35
3.6.1.3.- Químicos.	35
3.6.2. Materiales de laboratorio.	35
3.6.2.1. Biológicos.	35

3.6.2.2. Físicos.	36
3.6.2.3. Químicos.	36
3.6.3. Materiales de escritorio.	36
3.7. Tratamientos.	37
3.8. Manejo del experimento.	38
3.8.1. Recolección de muestras.	38
3.8.2. Frotis periférico: Técnica de los dos portaobjetos	38
3.8.3. Tinción Giemsa.	39
3.8.3.1. Procedimiento.	39
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>40</b>
4.1. Resultados.	40
4.2. Discusión.	56
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.</b>	<b>57</b>
5.1. Conclusiones.	57
5.2. Recomendaciones.	58
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Prevalencia de inclusiones citoplasmáticas de <i>E. spp.</i>	41
<b>Tabla 2:</b> Razas positivas a <i>E. spp.</i>	42
<b>Tabla 3:</b> Frecuencia de canes infectados por edades en meses	44
<b>Tabla 4:</b> Prevalencia de fases	46
<b>Tabla 5:</b> Casos en fase aguda	47
<b>Tabla 6:</b> Casos en fase aguda por edades	49
<b>Tabla 7:</b> Casos en fase crónica	51
<b>Tabla 8:</b> Canes en fase crónica por edades	52

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 1:</b> Prevalencia de inclusiones citoplasmáticas de <i>E. spp.</i>	41
<b>Gráfico 2:</b> Razas positivas a <i>E. spp.</i>	43
<b>Gráfico 3:</b> Frecuencia de canes infectados por edades en meses	45
<b>Gráfico 4:</b> Prevalencia de fases	46
<b>Gráfico 5:</b> Casos en fase aguda	48
<b>Gráfico 6:</b> Casos en fase aguda por edades	50
<b>Gráfico 7:</b> Casos en fase crónica	51
<b>Gráfico 8:</b> Canes en fase crónica por edades	53
<b>Gráfico 9:</b> Canes en fase subclínica por razas	54
<b>Gráfico 9:</b> Canes en fase subclínica por edades	55

## RESUMEN

El agente causal etiológico de la *Ehrlichiosis canina* es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Rickettsiaceae* y al género *Ehrlichia*. (Mutz. 2010). El microorganismo es inoculado al huésped final por la picadura de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Durante su ciclo biológico la *Ehrlichia spp.* se introduce en el animal hospedador como cuerpos elementales y una vez en el torrente sanguíneo, buscan las células mononucleares circulantes y los fagocitos mononucleares.

A través de encuestas realizadas por el autor previo a la elección del tema, se comprobó la presencia del ectoparásito garrapata marrón, en todas las casas del lugar universo de la tesis.

La investigación realizada sobre “Determinación de *Ehrlichia spp.* mediante el método periférico directo usando tinción de Giemsa en perros” tuvo como finalidad determinar la presencia de la *Rickettsia*, *Ehrlichia spp.*, tomando en cuenta la raza, edad y las tres fases de la infección de los canidos de la zona comprendida entre las calles 6 de marzo y Bolivia, parroquia Ximena, de la ciudad de Guayaquil, utilizando el método de frotis periférico directo de sangre con tinción Giemsa método que se trata de una coloración panóptica: que consiste en una tinción realizada sucesivamente por colorantes neutros.

La población total de caninos en el sector objeto de estudio, fue de 500 perros, extrayendo muestras sanguíneas a cada uno de estos, según los resultados obtenidos del análisis de los tratamientos el 11% fueron positivas, el 89 % negativas a *Ehrlichia spp.*, el 6% corresponde fase aguda, 23% fase crónica, 17% fase subclínica. En lo que respecta a la edad 43.85% representa a los caninos hasta 5 años, 17.54% a caninos comprendidos entre 6 y 10 años y 38.59% a caninos mayores de años. Los resultados en cuanto la raza fueron 68.42% para caninos de razas puras y 31.57% para caninos mestizos.

## ABSTRACT

The causal etiological agent of *canine ehrlichiosis* is a gram-negative bacterium belonging to the family and gender *Rickettsiaceae Ehrlichia*. (Mutz., 2010). The organism is inoculated to final host by the bite of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. During its life cycle the *Ehrlichia spp.* is introduced into the host animal as elementary bodies and once in the bloodstream, seeking circulating mononuclear cells and mononuclear phagocytes.

Through surveys conducted by the pre-selection of the theme author, the presence of the brown tick ectoparasite found in every home in the universe instead of the thesis.

The research on "Determining *Ehrlichia spp.* by direct peripheral method using Giemsa stain in dogs "had intended to determine the presence of *Rickettsia, Ehrlichia spp.*, taking into account race, age, and the three stages of infection of canids in the area between the streets March 6 and Bolivia, Ximena parish of the city of Guayaquil, using the method of direct peripheral blood smears with Giemsa staining method is a panoptic staining, that is a stain on successively by neutral dyes.

The total population of dogs in the area under study was 500 dogs, sanguineas extracting samples at each of these, according to the results obtained from the analysis of the treatments were 11% positive, 89% negative *Ehrlichia spp.* 6% were acute, 23% chronic phase, 17% subclinical phase. With respect to age representing 43.85% up to 5 years canines, canine 17.54% to between 6 and 10 years and older canines 38.59% years. The results regarding race were 68.42% for purebred dogs and 31.57% for mestizos canines.

## **PALABRAS CLAVES**

**EMC.-** *Erhlichiosis monocítica canina*

**RS.-** *Ripicephalus sanguineus*

**GIEMSA**

**Parroquia Ximena**

*Erhlichia spp.*

*Rickettsia*

## 1. INTRODUCCIÓN

El agente causal (etiológico) de la *Ehrlichiosis canina* es una bacteria gram negativa, de forma de coco o *cocobacilar* perteneciente a la familia *Rickettsiaceae* y al género *Ehrlichia*. (Mutz. 2010). El microorganismo es inoculado al huésped final por la picadura de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, misma que desarrolla su actividad en zonas tropicales (Cordero Del Capalio y Rojo Vásquez, 2011). Guayaquil al poseer este tipo de clima se convierte en un hábitat propicio para su desarrollo encontrándose en todos los hogares donde hallemos una mascota de familia de los canidos. Cabe recalcar que el perro puede sufrir múltiples infecciones de agentes etiológicos transmitidos por las garrapatas al mismo tiempo, esto, unido a los elevados costos de exámenes de laboratorio desemboca en una inexistencia de estadísticas sobre la incidencia de la enfermedad.

Es importante conocer información pertinente de la bacteria sus generalidades, la epidemiología, la fisiopatología y los signos clínicos, esto además de, las características del método de diagnóstico escogido para llevar a cabo en este trabajo son descritos en los capítulos subsiguientes.

### 1.1.- Antecedentes.

La *Ehrlichia spp.* principal agente causal de la *Ehrlichiosis*, fue la primera del grupo de las *Rickettsiales* descrita en perros, descubierta en el año 1934, en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien & Lestoquard, ellos luego de observar que cierta cantidad de perros internos en sus instalaciones e infestados por garrapatas, desarrollaban un proceso febril agudo que cursaba con anemia; percataron que los frotis sanguíneos de aquellos canes existían unos pequeños microorganismos en el interior de los monocitos. Al creer que se trataba de alguna especie de *riketssia* se lo nombró en primera instancia *Rickettsia spp.* (Davoust *et al*, 2013). Ya en el año de 1945 Moshkovshii sustituyó ese nombre por el actual *Ehrlichia spp.*, en memoria del reconocido médico alemán Paul Ehrlich. Estos autores también describen en 1936 *E. bovis* con la denominación *Rickettsia bovis*.

Existe la hipótesis de que la *E. phagocytophila* fue descrita por Tyzzer en 1938 como *Cytoecetesmicrociti*, empero no se registra evidencia fidedigna de este hecho. En el transcurso del tiempo se han ido describiendo otras especies. Con posterioridad en el año de 1957, Philip reagrupa los géneros de *Ehrlichia* tales como:

- *Neorickettsi ahelminthoeca* por Philip y colaboradores en 1953.
- *E. sennetsu* por Misao y Kobayashi en 1955.
- *E. equi* por Lewis y colaboradores en 1975.
- *E. platys* por French y Harvey en el año 1983.
- *E. risticii* por Hollandy colaboradores en 1985.
- *E. chaffeensis* por Anderson y colaboradores en el año 1991.
- *E. ewingii* por Anderson y colaboradores 1992.
- *E. muris* por Weny colaboradores en 1995.
- *Cowdria* y *Neoricketcia* en 2001.

## **1.2.- Planteamiento del problema.**

En Guayaquil los casos de *Ehrlichia. spp.* han sido diagnosticados netamente a través del método de diagnóstico clínico, basados en el cuadro de signos y síntomas, sin embargo no existen registros estadísticos en ninguna institución gubernamental que corrobore lo mencionado con antelación.

En países como España, Chile, Venezuela, se han reportado casos de *Ehrlichiosis monocitica* en humanos, obteniendo el título de enfermedad grave, es por ello que se debe tener en cuenta que si persistiere la problemática en nuestro país, podría producirse el salto epidemiológico de las mascotas a los propietarios.

Este proyecto busca describir la morbilidad canina portadora de la infección mediante el método de FROTIS PERIFÉRICO DIRECTO USANDO TINCIÓN DE GIEMSA, que arroje datos estadísticos fidedignos sobre la problemática, para así; lograr concienciar a las autoridades, Instituciones, respectivos ministerios y dueños de mascotas al desarrollo de estrategias destinadas a disminuir la población del agente vector terminando con el ciclo biológico del microorganismo.

Esto motivó a formularse el siguiente problema:

*¿Cuál es el índice de pacientes con Ehrlichia spp. confirmada, en 20 cuadras a la redonda de la zona correspondiente a las calles Seis de Marzo entre Bolivia y García Goyena, Sur de la ciudad , Guayaquil, 2014?*

### 1.3.- Justificación.

Debido a que la *Ehrlichia spp.* es una enfermedad emergente en países con climas templados y tropicales y ante la falta de estudios estadísticos y de campo existentes en Guayaquil en la población establecida para la presente investigación que aporta información que permite conocer su frecuencia en esta localidad en animales con el cuadro clínico correspondiente o diagnóstico presuntivo, además de ampliar conocimientos en las áreas mencionadas a continuación:

- **Justificación social:** Garantizar la salud y calidad de vida a los animales, mediante el control y prevención de los vectores.
- **Justificación contemporánea:** Conocer la situación actual de los animales domésticos, para poder adecuarlo a la realidad de nuestra región, proporcionando información y herramientas técnicas, para el desarrollo y progreso de la medicina veterinaria.
- **Justificación científica:** Promover la investigación y actualización en el área de la medicina veterinaria, para ofrecer soluciones a los problemas que se presentan a diario en la salud animal y la salud pública veterinaria.
- **Justificación personal:** Aplicar los conocimientos teóricos-prácticos adquiridos en los años de estudio universitario, para profundizar los conocimientos y destrezas en el área de clínica que nos permitirá obtener el título académico y realizar el ejercicio de la profesión.

## **1.4.- Objetivos.**

### **1.4.1.-Objetivo general.**

Determinar la presencia de inclusiones citoplasmáticas de *Erhlichia. spp.* en frotis sanguíneo directo periférico, empleando tinción de GIEMSA.

### **1.4.2.- Objetivos Específicos.**

- Evaluar la presencia de sintomatología compatible a *Erhlichia spp.* en perros participantes del proyecto.
- Determinar si la sintomatología en los perros es suficiente para sospechar de la enfermedad.
- Describir los factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad, en el sector universo de estudio.

## **1.5.- Preguntas de Investigación.**

1. ¿Los perros del sector escogido como universo presentan sintomatología compatible a *Erhlichia spp.*?
2. ¿La sintomatología en los perros es suficiente para sospechar de la enfermedad?
3. ¿El sector universo de estudio presenta factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad?

## 2. MARCO TEÓRICO

Las *ehrlichias* spp. son bacterias intracelulares Gram-negativas que se han reclasificado recientemente en base a estudios moleculares (Villiers y Blcakwood, 2012). Sin embargo es preciso tener en cuenta la evolución de su nomenclatura taxonómica a través de la historia.

### 2.1.- *Ehrlichia* spp.: Taxonomía y Nomenclatura.

Especie y tipo: *Ehrlichia* spp..

Tribu: *Ehrlichieae*.

Familia: *Rickettsiaceae*

Orden: *Rickettsiales*.

En 1980, la nomenclatura de la familia *Ehrlichsiaceae*, es incorporada a la lista aprobada de nombres bacterianos, lo que les confiere el estatus de nomenclaturas públicamente válidas.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. (Coll, *et al* 2010), en la actualidad por el contrario, los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. La ciencia ha desarrollado nuevas técnicas de clasificación genética, dueñas de una mayor precisión y objetividad así tenemos entre otras el análisis de secuencias de nucleótidos de genes o de aminoácidos de proteínas de membrana externa y los análisis antigénicos, conduciendo a la microbiología a la reorganización taxonómica de muchos agentes y han demostrado la imperfección de la anterior clasificación taxonómica.

Basándose en la secuencia del gen 16S rRNA, las especies anteriormente incluidas en los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* y *Neorickettsia* se reorganizarían en cuatro grupos genéticos (Dumler *et al*, 2001).

- **Grupo 1:** Amplia el género *Anaplasma*, incluyendo en él: además de las especies hasta entonces incluidas *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma caudatum*; las siguientes especies *Ehrlichia phagocytophilum* hoy llamada *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia bovis* actualmente *Anaplasma bovis* y *Ehrlichia platys* hoy *Anaplasma platys*. La especie tipo es *A. Marginale*.
- **Grupo 2:** El género *Ehrlichia* se amplía con la inclusión de *Cowdria ruminantium* ahora *Ehrlichia ruminantium*. La especie tipo es *E. spp.*; otras especies de este género son *E. chaffeensis*, *E. Ewingii* y *E. Muris*.
- **Grupo 3:** El género *Neorickettsia*, cuya especie tipo es *N. helminthoeca*, quedaría ampliado al incluirse en el mismo las especies *Ehrlichia risticii* y *Ehrlichia sennetsu* que pasan a denominarse *N. risticii* y *N. sennetsu* respectivamente.

## 2.2.- Distribución histórica y geográfica en América.

La primera identificación de *E. spp.* se realizó en Argelia como ya hemos mencionado, en América se reportaron casos en el año 1957, cuando los investigadores Bool y Sutmöller la detectaron en perros de la isla de Aruba y en 1962 aparece la primera descripción de *E. spp.* en Estado Unidos en el estado de Oklahoma (Paulino Ruiz, 2011).

Ewing y colaboradores (1971) hallan otro tipo de *Ehrlichia* en perros, esta parasitaba principalmente los granulocitos, muy parecida a la *E. equi* que afectaba a los caballos, pero recién en el año de 1992 fue reconocida como especie nueva y se la denominó *Ehrlichia ewingii*. En 1978 se identificó por primera vez en canes de Estados Unidos la *Ehrlichia Platys*, actualmente conocida como *Anaplasma Platys* (Barrios, 2012) esta parasitaba las plaquetas de los perros, y que producía en ellos trombocitopenia cíclica infecciosa.

## **2.2.1.- Ehrlichiosis en América Latina.**

### **2.2.1.1.- República Bolivariana de Venezuela.**

Los primeros casos reportados en La República Bolivariana de Venezuela, datan de 1982, estos fueron observados en frotis sanguíneos coloreados encontrándose tres especies: *E. spp.* (83.6%), *A. platys* (19.6%) y *E. equi* (1.8%) (Arraga, 1992 citado de Barrios, 2010).

### **2.2.1.2.- Chile**

Transcurría el mes de octubre de 1998 y en Chile se descubre el primer can infectado con *E. spp.* transmitida por el vector *Rhipicephalus sanguineus* en un canino que presentaba síntomas pertenecientes al cuadro característico de la *Ehrlichiosis* y antecedentes de infestación con garrapatas. El diagnóstico clínico fue confirmado en Alemania por inmunofluorescencia indirecta.

### **2.2.1.3.- Perú**

En este país se han realizado innumerables estudios, llegándose a descubrir incluso una nueva sepa de *E. spp.* en perros peruanos diagnosticada usando técnicas de PCR, remarcando así la importancia de la *ehrlichiosis* como una infección emergente en el Perú (Moro *et al.*, 2009).

### **2.2.1.4.- Brasil**

Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la prevalencia de *rickettsiosis* de 4.8% - 65% en perros de las zonas urbanas o rural, encontrándose que el 4.8% corresponde a *E. spp.* (Saito *et al.*, 2008) y en un estudio en el 2009 se encontró un 40% (28/70) de los perros con sintomatología de *ehrlichiosis* contenían ADN de *E. spp.* en su sangre (Ueno *et al.*, 2009)

### **2.2.1.5.- Ecuador**

En nuestro país no existen datos estadísticos reportados sobre primeros casos encontrados, ni cantidad de casos estudiados. Salvo un estudio sobre prevalencia realizado en la Universidad de Cuenca.

### **2.3.- Especies de *Ehrlichia* que infectan canes.**

Se conocen 2 especies de la bacteria estudiada que infectan al can, estas son:

- *Ehrlichia spp.*
- *Ehrlichia ewingii*

Aunque si bien es cierto para propósitos de esta investigación nos centraremos en la *E. spp.* como objeto de estudio, es importante describir las otras subespecies del género *Ehrlichia*.

#### **2.3.1.- *Ehrlichia ewingii***

Esta cepa de *Ehrlichia* se caracteriza por infectar a los granulocitos: neutrófilos y eosinófilos canes. La garrapata *Amblyomma americanum* sirve como su vector biológico, sin embargo esta tiene una distribución geográfica exclusiva en los Estados Unidos de Norteamérica por lo que esta forma de la enfermedad la encontramos solo en esta área. No obstante, recientemente se ha observado la infección natural de este agente en otras especies de garrapatas como, *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis* en Oklahoma (Murphy et al., 1998 citado de Paulino 2011).

### **2.3.2.- Ehrlichia spp.**

La *Ehrlichia spp.* es una de las bacterias más comunes transmitidas por garrapatas a nuestras mascotas. En la actualidad presenta una distribución mundial, lo cual se atribuye a que el vector *Rhipicephalus sanguineus*, es la especie del ectoparásito más ampliamente distribuida en el mundo, con excepción de la Antártica (Weinborn *et, al* 2012).

### **2.4.- Descripción de la Ehrlichia canis – Ehrlichiosis monocítica Canina.**

Como se ha visto y teniendo en cuenta la explicación de Villiers y Blacwood (2012), los Organismos *Ehrlichia* presentan tropismo por diferentes células. En este apartado pretendemos brindar información sobre la etiología de *Ehrlichiosis monocítica canina*, fisiopatología, distribución del agente causal y las características del vector que la propaga.

#### **2.4.1.- Fisiopatología**

##### **2.4.1.1- Patogénesis**

Tratándose de un microorganismo parásito intracelular obligado la *E. spp.* requiere de un vector para poder pasar de un hospedador a otro, sin la intermediación de alguno de estos requisitos la *rikettsia* no podría subsistir. Su transmisión ocurre de forma transestadial, esto es según Robit y colaboradores (2010) cuando un agente patógeno se mantiene en el vector mientras se desarrolla durante sus distintos estadios de vida.

Al alimentarse de animales que pasan por la fase aguda de la enfermedad (aunque existen casos reportados en la fase sub-clínica), la garrapata adquiere el agente. Ya en el vector, la bacteria pasa del intestino, a las glándulas salivales para así poder ser transmitido a un nuevo hospedador, el artrópodo tiene la capacidad de transmitir la infección de acuerdo a datos obtenidos de

Dolz y colaboradores (2013) hasta 155 días después de haber recibido el microorganismo.

Durante su ciclo biológico la *Ehrlichia spp.* se introduce en el animal hospedador como cuerpos elementales y una vez en el torrente sanguíneo, buscan las células mononucleares circulantes y los fagocitos mononucleares, se introducen en ella por endocitosis mediada por un receptor o por fagocitosis, se multiplican pasando a cuerpos iniciales y posteriormente a mórulas, estas se disgregan en cuerpos elementales una vez que la célula infectada se rompe invadiendo otras nuevas hasta instaurar la parasitemia.

Una gran variedad de factores como el tamaño de inóculo, cepa de *Ehrlichia*, inmunidad del paciente, enfermedades concomitantes producidas por otros parásitos transmitidos por garrapatas, pueden influir en el curso y el resultado de la infección. No hay predilección de edad y sexo en esta enfermedad, sin embargo parece que los Pastores Alemanes son más susceptibles.

#### **2.4.1.2.- Desde la inoculación hasta la fase aguda**

EL periodo de incubación de la enfermedad es de 8 a 20 días luego de esto se inicia la fase aguda, esta dura entre dos o cuatro semanas, en este periodo, el parásito ingresa al torrente sanguíneo y linfático y se localiza en los macrófagos del sistema retículo endotelial del bazo, hígado y ganglios linfáticos, donde se replica por fisión binaria en estos órganos causa una hiperplasia de células plasmáticas que en la clínica se suele traducir en un aumento en el tamaño en ellos. Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan a las *rickettsias* hacia otros órganos del cuerpo como pulmones, riñones y meninges pudiendo provocar lesiones inflamatorias y vasculitis generalmente en perros inmunodeprimidos En algunos casos, el cuadro puede desencadenar una coagulación intravascular diseminada que puede acabar con la vida del animal (Sainz et al., 2000. Citado de Paulino, 2011).

Aproximadamente a los 10 a 14 días post infección todos los perros infectados pueden presentar fiebre presumiblemente por la producción incrementada de interleucina-1 (IL-1), por células presentadoras de antígeno y células B o productos pirógenos exógenos del parásito.

Alrededor de los 15 a 20 días post infección sucede una lisis y consumo de plaquetas dando como resultado la trombocitopenia inducida por la presencia de la producción de anticuerpos antiplaquetarios, La inducción para la producción de estos anticuerpos es ejercida por los antígenos ehrlichiales, que aparentemente son antigénicamente similares a las moléculas plaquetarias, esto explicaría porque el sistema inmune está involucrado en la destrucción celular.

La fase aguda puede durar entre 2 y 4 semanas. Los perros mal tratados o no tratados pueden desarrollar posteriormente una fase sub-clínica que aunque sin signos clínicos de la enfermedad mantiene recuentos bajos de plaquetas (Rome-Blancas, 2010)

#### **2.4.1.3.- Fase sub-clínica**

La fase sub-clínica de la enfermedad aparece a las 6 o 9 semanas, aunque su duración es indefinida se estima que podría mantenerse entre 1 mes a 5 años aproximadamente (Martínez, 2014). Aquí el animal recupera el peso perdido y resuelve la hipertermia llegando a tener temperatura corporal normal. Si el sistema inmunológico del animal es competente la bacteria suele ser eliminada.

Al ser esta fase asintomática el cuadro clínico del perro parece normal, el cuadro de eritrocitos se regula, no obstante en ocasiones las alteraciones hematológicas continúan sobre todo en lo concerniente a déficit plaquetario por la trombocitopenia, a nivel de bioquímica sanguínea se evidencian hiperglobulinemia (hipergammaglobulinemia) e hipoalbuminemia.

Cabe recalcar que es importante detectar la fase sub-clínica de la enfermedad para evitar que logre desarrollarse la fase crónica.

#### **2.4.1.4.- Fase crónica**

La capacidad ineficiente de la respuesta inmunológica del paciente, el estrés, las coinfecciones, los malos tratamientos o la ausencia de ellos conduce a la génesis de la fase crónica.

Podemos diferenciar dos niveles de esta fase estas son (Noriega, 2012):

- **Fase crónica leve.-** Se manifiesta por pérdida de peso con alteraciones hematológicas
- **Fase crónica grave.-** Ocurren los siguientes síntomas:
  - Trombocitopenia, que den síntomas tales como palidez de mucosas, petequias, equimosis en mucosas, y/o hemorragias importantes (epistaxis).
  - Nefropatía perdedora de proteínas, como una glomerulonefritis que se origina por depósito de inmunocomplejos sobre los capilares del glomérulo. Esto da lugar a proteinuria que en algunos casos puede llevar a hipoalbuminemia lo que explicaría otro síntoma que se puede observar en *Ehrlichiosis* edemas en la parte ventral del cuerpo (extremidades, escroto).
  - Disnea o tos por el edema intersticial a nivel del pulmón.
  - Hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía.
  - Signos oculares, como otra consecuencia de la glomerulonefritis, ya que son animales que tienden a hipertensión sistémica (como cambio de color en los ojos, ceguera y con bastante frecuencia uveítis, hipema, retinitis, desprendimiento de retina).

- Alteraciones neuromusculares principalmente causadas por meningitis inflamatoria o hemorrágica (hiperestesia, estados de estupor, o convulsivos).
- Cojeras, rigidez en la marcha por depósitos de inmunocomplejos en las articulaciones.
- Glomerulopatía y la vasculitis desarrollando hipergammaglobulinemia y la hipoalbuminemia.
- Destrucción continua de eritrocitos produciendo anemia no regenerativa y también por depresión de la médula ósea.
- Pérdida crónica de sangre y la existencia de hipoplasia o aplasia medular.
- Aparición de proteinuria y hematuria, con o sin uremia, está relacionada con la existencia de lesiones glomerulares inmunomediadas.

### **2.5.- *Ehrlichia spp.* versus Respuesta Inmune.**

Los signos y síntomas que se generan en el desarrollo de la infección son proporcionales a la respuesta inmunológica del paciente, por esta razón en la fase aguda los perros tienen pronóstico bueno, empero se vuelve reservado en la fase crónica. Según Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al.*, 1999 (citado por Paulino, 2011). La excesiva producción de anticuerpos en presencia de una respuesta celular disminuida tiene un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad.

Resulta trascendental entonces conocer sobre todos los mecanismos del sistema inmune de los canes y su impacto en la resistencia ante la *Ehrlichia spp.*, pues, esto nos servirá para comprender mejor la inmunopatología de la enfermedad.

### 2.5.1.- Respuesta inmune no específica: Inmunidad adquirida.

Las barreras físicas suelen bloquear la invasión de agentes bacterianos, en el caso de la *E. spp.* la piel es vulnerada por la introducción del agente patógeno directamente al torrente sanguíneo por la picadura de la garrapata, es aquí donde actúa el sistema de respuesta inmune innata. La inmunidad innata se basa en el hecho de que los microorganismos invasores son químicamente distintos de los componentes normales del organismo (Tizard, 2009). Las paredes celulares de las bacterias pueden ser destruidas por enzimas o existen células que pueden reconocer las moléculas asociadas a microorganismos invasores; estos mecanismos defensivos se denominan:

- Fagocitosis.- Unión del agente particulado a la superficie de una célula fagocítica, emisión de pseudópodos y englobamiento:
  - Macrófagos
  - PMN Neutrófilos

Para activarse el mecanismo de la fagocitosis, es necesario que el patógeno entre en contacto con la célula y se adhiera a su superficie. Para ello existen proteínas de superficie que actúan como receptores celulares para los ligandos bacterianos de *Ehrlichia spp.* (Messick y Rikihisa, 1993, citado de Paulino, 2011).

La *E. canis* pierde su capacidad infecciosa a las pocas horas de estar en un medio extracelular; al ser esta intracelular obligado ha desarrollado enzimas en su parénquima que le permite multiplicarse en el citoplasma de los fagocitos.

- Sistema de complemento.- Conjunto de proteínas del plasma que interactúan entre sí y con otros elementos de los sistemas inmunitarios innato y adquirido.

- Las células Natural Killer.- Población de linfocitos encargados de atacar a la células infectadas.
- Citoquinas .- Las citoquinas: Conciste en una cantidad considerable de moléculas diferentes, que tiene como objetivo principal transmitir señales entre células (linfocitos, fagocitos y otras células) en el curso de una respuesta inmunitaria. Son proteínas producidas por células implicadas en el proceso infeccioso que regulan todos los procesos biológicos importantes como: el crecimiento celular, la activación celular, la inflamación y la inmunidad; además de compartir la habilidad de activar y dirigir la migración de los diferentes tipos de leucocitos.

### **2.5.2.- Respuesta inmune específica: Inmunidad innata**

Como se menciona en el curso de Inmunología de la Universidad Complutense de Madrid (2009) la respuesta inmune específica sólo se desarrolla tras el reconocimiento específico del agente extraño (antígeno) durante un determinado periodo de tiempo. Esta memoria específica propulsa magnitud y la rapidez de las respuestas en otros posibles contactos con el mismo antígeno.

Todo este sofisticado sistema es guiado por componentes específicos en el caso de la inmunidad celular son los linfocitos T y B; en tanto en la inmunidad humoral intervienen anticuerpos, complementos y citoquina.

### **2.5.3.- Inmunidad Celular**

Conducida por los linfocitos T citotóxicos dirigidos contra las células infectas (López, 2011). Se ha observado que los linfocitos producidos en perros infectados por *E. spp.* eran citotóxicos para los monocitos autólogos; el o los antígenos involucrados en este fenómeno no han sido definidos. La presencia

de una inmunidad mediada por células se confirma por la inducción de una blastogénesis marcada en los esplenocitos obtenidos de canes infectados reexpuestos a antígenos *Ehrlichia*. No obstante, es preciso determinar con precisión la naturaleza de la acción de los linfocitos T en la *ehrlichiosis* para facilitar la identificación de los antígenos protectores.

#### **2.5.4.- Inmunidad Humoral**

Con respecto a la naturaleza de cómo reacciona el sistema inmunológico ante la *E. spp.* existe muy poca información. Actualmente se ha establecido que hay inducción de anticuerpos neutralizantes de tipo IgG. y que esos anticuerpos actúan por conducto de una citotoxicidad dependiente de anticuerpos dirigida contra los macrófagos infectados.

Al tiempo que los agentes patógenos se eliminan aparecen los anticuerpos neutralizantes, lo que da carácter de muy importante a los mespp.mos humorales desde la mirada de la protección inmunitario, estos no intervienen en la absorción del agente patógeno sino que interfieren con la supervivencia de a *riketsia* en el macrófago.

#### **2.6.- Agente vector: Garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus***

Los parásitos externos, o ectoparásitos, que afectan animales domésticos y silvestres y al hombre, son en su mayoría artrópodos, organismos de exoesqueleto quitinoso y patas articuladas, que poseen reproducción sexual y sufren de ecdisis durante su período de crecimiento (Benavides, 2011) . De estos exceptuando los mosquitos, las garrapatas son los agentes vectores que mayor cantidad de organismos infecciosos transmiten ya sean protozoos, virus, bacterias y hongos.

Existen más de 800 especies de garrapatas a nivel mundial (ESCCAP, 2012). Este apartado lo destinaremos a la descripción de la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, agente vector de la *E. spp.*.

### **2.6.1.- Taxonomía: Clase *Arachnida* – Sub-clase *acari***

Entre los arácnidos, la subclase *Acarise* agrupa a los organismos comúnmente conocidos como ácaros y garrapatas (Becerril Flores, 2009), aquí se engloban las ordenes *Acariformes* y *Parasitiformes*.

Las garrapatas forman parte del sub-orden *Ixodida* del orden *Parasitiformes*, pueden pertenecer a una de estas tres familias:

- Familia *Ixodidae* o garrapatas duras.
- Familia. *Argasidae* o garrapatas blandas.
- *Nuttalliellidae*

La familia *Ixodidae* se subdivide en *Proscrita* representada por un solo género *Ixodes*, y por la *Metastrata* donde se incluye el género *Rhipicephalus*, a la que pertenece la garrapata estudiada.

### **2.6.2.- Género *Rhipicephalus*: Características Morfofisiológicas**

Reciben el nombre de garrapatas duras pues su cutícula es lisa y endurecida, de ahí su nombre, aunque pueden presentar festones en su borde terminal; exhiben un cuerpo dividido en dos regiones: gnatosoma e idiosoma. La región anterior o gnatosoma también se denomina capítulo mismo que en la garrapata marrón del perro se muestra de forma hexagonal cuando es visto dorsalmente. Esta sección presenta las piezas bucales representadas por quelíceros y una estructura especializada para la fijación denominada hipostoma. Además se

encuentran los pedipalpos. El idiosoma es la región posterior y en él se ubican las patas. Las aberturas espiraculares o estigmas se localizan por detrás del cuarto par de patas.

Las hembras son mucho más grandes que los machos y presentan un escudo dorsal de tamaño proporcional menor que el de los machos (Rovid, 2012)

### **2.6.3.- Distribución de la enfermedad**

La garrapata marrón del perro es la especie de mayor distribución en cánidos domésticos. La prevalencia de las infecciones por *Ehrlichia spp.* (*Rhipicephalus sanguineus*), *Anaplasma gocytophilum* (*Ixodes ricinus*) y *A. platys* (*R. sanguineus*) se corresponden a la distribución de sus vectores respectivos (ARGOS, 2014), esto quiere decir que en cualquier parte del mundo que ofrezca las características necesarias para la proliferación del vector se podrá hallar la presencia de *E. spp.*, reconocemos entonces que la bacteria tienen distribución mundial, exceptuando la Antártida.

### **2.6.4.- Ciclo de vida: *Rhipicephalus sanguineus***

El ciclo de vida de las garrapatas duras se completa en menos de 2 meses tiene los siguientes estados: huevo, larva, ninfa y adulto (macho y hembra).

Las hembras ponen en promedio 200 a 3 mil huevos diarios después de haberse alimentado de sangre, los ocultan en el suelo, el piso, las paredes de los hogares con mascotas y en los lugares donde los perros duermen o descansan (Martínez Labat, 2014).

La larva al salir del huevo tiene seis patas. Desarrollará sus ocho patas al igual que los adultos luego de mudar su exoesqueleto, las larvas pueden estar sin ingesta de sangre hasta 8 días, al conseguir hospedero se alimentan de este por tres días aproximadamente luego de ello abandonan al can para en más o

menos siete días convertirse en un siguiente estado denominado ninfa, ambas son de color marrón rojizo uniforme, tienen un cuerpo achatado y con un diámetro de 1.8 milímetros.

Hasta encontrar otro hospedero las ninfas pueden sobrevivir seis días sin alimento, al conseguir uno nuevo, se nutren de su sangre por cerca de 2 a 3 días, dejando después de este periodo para evolucionar a la etapa adulta.

## **2.7.- Diagnóstico**

Se hace necesario realizar un buen diagnóstico clínico, tomar en cuenta el antecedente de infestación por garrapatas, sumado a una prueba serológica que permita detectar el contacto del animal con el agente infeccioso (Weinborn, 2012).

Con este objetivo describiremos las formas de diagnóstico:

### **2.7.1.- Diagnóstico Clínico**

La *Ehrlichiosis canina* es una enfermedad multisistémica (Rojas Triviño, et. al, 2013); aunque para su confirmación es importante el examen de laboratorio, es importante tener en cuenta los signos clínicos que se han descrito desde el descubrimiento de la bacteria.

### **2.7.2.- Signos multisistémicos**

Los signos más frecuentes son: depresión, letargia, pérdida de peso leve y anorexia, con o sin tendencias hemorrágicas. La hemorragia suele presentarse por petequias dérmicas o equimosis y en ocasiones ambas. A pesar de que pueden ocurrir hemorragias de cualquier superficie mucosa, la epistaxis es más frecuente. El examen físico puede revelar también linfadenomegalia y

esplenomegalia en un 20 y 25 % de los pacientes, respectivamente. (Rojo Blancas, 2011).

Es preciso tener en cuenta que la *Ehrlichiosis canina*, al ser transmitida por garrapatas, vector de múltiples agentes patógenos, puede presentarse una coinfección.

### **2.7.3.-Signos Oculares**

Existe la posibilidad de que los canes presenten cambios en la coloración o la apariencia de los ojos o desarrollen ceguera, no obstante con mayor frecuencia se puede encontrar: uveítis anterior y enfermedad retinal, como corioretinitis, papiledema, hemorragia retinal, infiltrados perivasculares retinales y desprendimiento de retina bulloso, y pueden dar como resultado ceguera aguda (Waner, *et al*, 2013).

### **2.7.4.-Signos neuromusculares**

Resultado de meningitis por inflamación o hemorragias, se pueden desarrollar signos neurológicos, como disfunción neurológica con daño al tejido nervioso tanto periférico como central.

### **2.7.5.-Infecciones secundarias concurrentes**

Las garrapatas pueden alojar organismos patógenos múltiples que dan como resultado coinfecciones en el perro infectado. Deben interpretarse con cuidado los resultados positivos de métodos de detección de ácido nucléico o reactividad de anticuerpos con respecto a *Ehrlichia*, ya que son la única causa de enfermedad clínica, a menos que se haya evaluado una gran variedad de patógenos potenciales. Además, los perros con *ehrlichiosis* pueden identificarse

en forma secundaria con enfermedades oportunistas por protozoos, hongos o bacterias (Dubey, et al. 2009). Las pruebas de *ehrlichia* deben considerarse como una evaluación de inmunocompetencia de huésped en perros con diagnóstico de infecciones oportunistas.

Para poder realizar un diagnóstico específico un tanto más claro, previo al análisis de laboratorio es preciso verificar los signos específicos de la Especie *Ehrlichia*:

- Las infecciones por *E.spp.* pueden ser agudas o crónicas.
- El perro actúa como huésped reservorio de esta infección.
- Las infecciones persistentes crónicas pueden dar como resultado pancitopenia o hiperglobulinemia.
- Hiperglobulinemia es policlonal.
- Gammapatia monoclonal.
- Ginfocitosis granular.

#### **2.7.6.- Diagnóstico de Laboratorio**

El laboratorio clínico, es una de las herramientas más utilizadas para el diagnóstico de las enfermedades hemoparasitarias, ya que ayuda al clínico a enfocar el diagnóstico, sin embargo, la identificación del agente etiológico de la enfermedad hemoparasitaria, junto con el análisis de los signos clínicos y los resultados de patología clínica, permite el diagnóstico definitivo de la enfermedad (Gonzales y Lesmes, 2013).

En los párrafos subsiguientes se presentan las pruebas de laboratorio que pueden servirnos para identificar al agente patógeno.

### **2.7.7.- Métodos directos**

Se basa en la detección u observación del agente etiológico a partir de muestras de sangre obtenidas del animal sospechoso. La identificación de las mórulas, los cuerpos elementales y/o iniciales de *E. spp.* en el interior de los linfocitos y/o monocitos sanguíneos de un perro constituyen una prueba inequívoca de su infección (Ascaso, 2001, citado de Dominguez, 2011).

### **2.7.8.- Alteraciones Hematológicas**

Los cambios hematológicos están mejor documentados en infecciones por *E.spp.* incluyen trombocitopenia (82%), anemia (82%), la que, en general, es no regenerativa, y leucopenia (32% de la cual el 20% presentaba neutropenia). (Troy, et al.1990; von Stedingk, et al. 1997, citado de Romero Blanco, 2011).

El hallazgo que se presente con mayor frecuencia en todas las etapas es la Trombocitopenia, de acuerdo a Bulla y sus colaboradores en un estudio realizado en el 2004 (Ibid, 2011).Se presenta una correlación entre un PCR elevado y un una disminución de plaquetas <100.000 plaquetas/ $\mu$ L.

En la fase aguda de la enfermedad es común la leucopenia y la anemia moderada (usualmente normocítica, normocrómica, no regenerativa). En la fase subclínica se observa generalmente una trombocitopenia moderada, pudiendo haber un descenso en el número de los neutrófilos; los parámetros de eritrocitos no son afectados normalmente en esta etapa de la enfermedad. La trombocitopenia severa, leucopenia y anemia se presentan más comúnmente durante la fase crónica de la EMC (Waner y Harrus, 2000 citado de Paulino, 2011). La fase crónica grave se caracteriza por la presencia de pancitopenia severa, misma que ocurre como resultado de una médula ósea hipocelular suprimida.

En tanto a la bioquímica sanguínea se pueden identificar:

- Hiperproteinemia(33%).
- hiperglobulinemia (39%).
- hipoalbuminemia (43%).
- Alaninaaminotransferasa elevada (43%).
- Fosfatasa alcalina elevada (31 %).

## **2.8.- Frotis Periférico**

El frotis periférico, es un método de laboratorio que se utiliza para el estudio de las características citológicas de las células de la sangre (Domínguez, 2011). Para ello se utiliza la sangre periférica debido a que la *E.spp.* afecta con mayor frecuencia los monocitos y linfocitos en este nivel, con el propósito de mayor éxito en la detección de la mórula se sugiere sangre capilar de orejas o rabo. Es muy importante que el frotis y la posterior tinción se realicen con precisión pues de ello dependerá la veracidad de los datos.

Con tinciones Tipo GIEMSA las inclusiones intracitoplasmáticas se observan de color violáceo oscuro aunque, en ocasiones pueden adquirir una tonalidad rosa-azulada. Con tinciones de Wright se observan de color violáceo o rojizo (Barrios, 2011)

### **2.8.1.- Tinción de Giemsa**

De acuerdo a Nieto (2010) la tinción de Giemsa es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos. Se trata de una coloración panóptica: que consiste en una tinción realizada sucesivamente por colorantes neutros.

- **Técnica:** Se realiza una extensión de sangre en una placa porta objeto y se la fija con alcohol metílico durante tres minutos; posteriormente se sumerge la extensión en una solución diluida al 1.9 de colorante Giemsa

y agua destilado durante 20 minutos aproximadamente; finalmente se aclara y se deja secar.

- **Interpretación:**

- **Hematíes:** Color Rosado
- **Plaquetas:** Color Lila
- **Citoplasmas:** Azul Claro
- **Núcleos:** Azul oscuro o morados
- **Granul. Eosinofilos:** Color anaranjado
- **Granul. Basófilos:** Color purpura/azul oscuro

### **2.8.2.- Tinción de Wright**

La tinción de Wright es una modificación de la tinción de Romanowsky que se utiliza en la tinción diferencial de elementos celulares de la sangre (Sigma-Aldrich, 2013). Puede ser empleada en la tinción de frotis de sangre o de medula ósea

- **Técnica:** Se fija la extensión, se añade la cantidad necesaria de colorante cubriendo totalmente la muestra y que además evite la evaporación. Trascorridos 5 a 7 minutos se añade al líquido colorante una cantidad igual de solución amortiguadora o agua destilada es importante impedir que la mezcla se rebose del portaobjetos. Al finalizar los 20 o 25 minutos se aclara la tinción con agua hasta que las partes delgadas adquieran una tonalidad amarillenta o rosada; teniendo siempre en cuenta que el lavado debe de hacerse en posición horizontal.

- **Interpretación:**

- **Hematíes:** Color rosado
- **Plaquetas:** Color lila
- **Citoplasmas:** Color azul claro
- **Núcleos:** Color azul oscuro o morados
- **Granulocitos Eosinófilos:** Color naranja
- **Granulocitos Basófilos:** Color purpura o azul oscuro

### **2.8.3.- Alteraciones en la Orina**

Un gran porcentaje de las alteraciones en orina es detectado en infecciones experimentales durante la fase aguda de la infección; estas son:

- Proteinuria
- Hematuria

Experimentalmente se observa una pérdida máxima de proteínas urinarias, que consiste en especial de albúmina, dos y media a tres y media semanas después de la inoculación y se resuelve alrededor de las seis semanas después de la infección (Neer, 2000, citado en Paulino, 2011). Con la aparición de la fase subclínica estos signos desaparecen para volver otra vez durante la fase.

### **2.8.4.- Métodos Indirectos**

Una alternativa a la observación directa, que como anteriormente ha quedado de manifiesto no es siempre eficaz, es la detección de la presencia de un agente infeccioso por medio de la valoración de la respuesta inmunitaria del hospedador. (Ascaso, 2001 citado en Domínguez, 2011). Las pruebas descritas a continuación son las más empleadas.

### **2.8.5.- Método de Inmunoabsorción Ligada de Enzimas (ELISA)**

Método de análisis confiable, capaz de ofrecer un diagnóstico rápido de la enfermedad. El snap combo Kit por ejemplo es un método de inmunoabsorción ligada de enzimas (ELISA) del laboratorio IDEX, esta identifica una región inmunodominante P30 para lo cual utiliza anticuerpos monoclonales 111H7.

### **2.8.6.- Método de Western Immunoblot**

El inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular). Encontramos tantas posibilidades como tipos de electroforesis existen. Luego son transferidas a una membrana adsorbente de nitrocelulosa para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia u otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

### **2.8.7.- Diagnóstico molecular**

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerasechainreaction o PCR) es una técnica molecular basada en las propiedades bioquímicas del ADN, asociadas a la composición y secuencia de nucleótidos. La PCR emplea segmentos cortos y simples de nucleótidos, llamados cebadores, cuyas secuencias son complementarias de las secuencias del ADN del organismo que se investiga. La amplificación de los cebadores permite la identificación del ADN bacteriano. Los cebadores y otros reactivos necesarios para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa se añaden a un volumen de solución que contiene ADN representativo de la muestra de estudio, incluido ADN del hospedador y del microorganismo que se busca. La muestra puede ser

cualquier tejido del hospedador que pueda portar al agente investigado (Sellon, 2003 citado de Paulino, 2011).

#### **2.8.8.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI).-**

La inmunofluorescencia, es una técnica como todos los inmunoensayos, que aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunoquímicas en que aquí la marca unida al anticuerpo es una molécula fluorescente.

### **3. MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1.- Detalle de las metodologías**

##### **3.1.1.- Diseño metodológico**

El desarrollo del presente trabajo está enmarcado en los parámetros del DISEÑO CUALI-CUANTITATIVO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, porque se basa en datos descriptivos de los canes participantes en el proyecto, requiriendo para esto que cumplan con el cuadro clínico propio de la *Ehrlichia spp.* en sus tres fases, para ello se propuso un análisis estadístico, intentando conocer la cantidad de perros infectados con el agente objeto de estudio.

##### **3.1.2.- Tipo de investigación**

Acorde con el planteamiento del problema y lo propuesto en los objetivos, se realizó una investigación de tipo descriptiva, pues se determinó la presencia de mórulas de *E. spp.* en frotis sanguíneos periférico directo, de perros con síntomas y asintomáticos de para posteriormente realizar el examen de laboratorio con tinción de Giemsa y poder diagnosticar Ehrlichiosis.

### 3.2.- Variables a evaluar.

Variable	Índice	Indicadores
Canes con sintomatología y asintomáticos compatible a <i>Ehrlichiosis monocítica spp.</i>	<p>Infestación evidente de garrapatas</p> <p><b>Fase Aguda:</b> Pérdida de peso, anorexia, letargia, hipertermia, (41° C), linfadenomegalia, exudado óculo-nasal seroso o purulento, hemorragias, disnea,</p> <p><b>Fase subclínica:</b> puede durar de meses a años. En esta fase el animal recupera el peso perdido y resuelve la hipertermia llegando a tener temperatura corporal normal. En algunos animales puede ser eliminado el parásito, (si su estado inmune es competente). Aunque en la mayoría persiste,</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Animales que presenten un cuadro clínico compatible con las alteraciones que produce <i>E. spp.</i>.</li><li>• Historial de infestación por garrapatas.</li><li>• Área endémica de <i>Ehrlichiosis</i>: zonas de climas cálidos y húmedos.</li></ul>

instaurándose así la fase crónica.

**Fase crónica:** puede manifestarse como una enfermedad leve con alteraciones hematológicas y de peso irrelevantes, o por el contrario, se pueden generar cuadros con:

a) Trombocitopenia, que den síntomas tales como palidez de mucosas, petequias, equimosis en mucosas, y/o hemorragias importantes (epistaxis).

b) Nefropatía perdedora de proteínas, como una glomerulonefritis que se origina por depósito de inmunocomplejos sobre los capilares del glomérulo. Esto da lugar a proteinuria que en algunos casos puede llevar a hipoalbuminemia lo que explicaría otro síntoma que se puede

	<p>observar en <i>Ehrlichiosis</i>: edemas en la parte ventral del cuerpo (extremidades, escroto).</p> <p>c) Disnea o tos por el edema intersticial a nivel del pulmón.</p> <p>d) Hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía.</p> <p>e) Signos oculares, como otra consecuencia de la glomerulonefritis, ya que son animales que tienden a hipertensión sistémica (como cambio de color en los ojos, ceguera y con bastante frecuencia uveítis, hipema, retinitis, desprendimiento de retina).</p> <p>f) Alteraciones neuromusculares principalmente causadas por meningitis inflamatoria o hemorrágica (hiperestesia, estados de</p>	
--	---	--

	<p>estupor, o convulsivos...).</p> <p>g) Cojeras, rigidez en la marcha por depósitos de inmunocomplejos en las articulaciones</p> <p>.Infestaciones por <i>Ehrlichia resticii</i> o cepas granulocíticas provocan estos cuadros: cojera, tumefacción o dolor articular.</p>	
<p>Inclusiones citoplasmáticas (mórulas) de <i>Ehrlichia spp.</i> en frotis sanguíneo directo periférico</p>	<p>Avistamiento de la Mórula de <i>E. spp.</i> en monocitos en un frotis sanguíneo en tinción Giemsa</p>	<p>Microscopia</p>

### **3.3.- Análisis estadístico.**

Debido a la naturaleza de la investigación durante el desarrollo del presente estudio, se obtuvieron medidas de tendencia central y medidas de dispersión. También se realizaron gráficos para representar los resultados obtenidos.

### **3.4.- Ubicación del ensayo.**

El presente proyecto de tesis se llevó a cabo en 500 pacientes caninos que presentaron síntomas o no (asintomáticos) propios de la infección en el sector comprendido entre las calles *Seis de Marzo entre Bolivia y García Goyena* al sur de la ciudad de Guayaquil. (Ver Anexo N° 1)

### **3.5.- Características climáticas.**

La ciudad de Guayaquil se encuentra a una elevación promedio de 4 mts. sobre el nivel del mar. La temperatura media anual de la Ciudad es de 25.5°C, con variaciones anuales en la estación lluviosa y seca, registrándose una temperatura máxima absoluta promedio anual de 33,5 °C y una mínima absoluta promedio anual de 18.9°C. La garrapata *Rhipicephalus sanguíneus*, encuentra este lugar propicio para su hábitat.

### **3.6.- Materiales**

#### **3.6.1.- Materiales de campo**

##### **3.6.1.1.- Biológicos:**

Canes de 20 cuadras a la redonda del sector comprendido por las calles Seis de marzo entre García Goyena y Bolivia compatibles con los síntomas y también los canes asintomáticos.

##### **3.6.1.2.- Físicos:**

- Lancetas con disparador
- Guantes de examinación
- Portaobjetos
- Mandil
- Hojas de campo
- Caja porta placas
- Algodón
- Bozal

##### **3.6.1.3.- Químicos:**

- Alcohol metílico

#### **3.6.2.- Materiales de laboratorio:**

##### **3.6.2.1. Biológicos:**

- Sangre periférica directa de canes

### **3.6.2. 2. Físicos:**

- Microscopio
- Porta objetos
- Mandil
- Guantes de examinación
- Cinta masking
- Cámara para fotos
- Hojas de laboratorio

### **3.6.2.3. Químicos:**

- Colorante de Giemsa
- Aceite de cedro (inmersión)
- Alcohol metílico
- Agua destilada

### **3.6.3.- Materiales de escritorio:**

- Computadora
- Impresora
- CDs
- Cámara de fotos
- Memory flash
- Esferográficos
- Papel bond

### 3.7.- Tratamientos

A través de encuestas realizadas por el autor previo a la elección del tema, se comprobó la presencia de este ectoparásito (garrapata *Rhipicephalus sanguineus*), en todas las casas del lugar universo de la tesis.

EL objeto de estudio está constituido por todos los perros que se encuentren dentro del sector objeto de la investigación que se realizó.

Los criterios de inclusión para participar del proyecto son:

- Perros infestados con garrapatas durante su historia.
- Perros con síntomas y signos correspondientes a *Ehrlichia spp.*
- Perros asintomáticos para diagnosticar fase sub clínica de la infección.

De una población total de 500 perros a través del análisis clínico se obtuvo un resultado de 57 perros que presentan los criterios de inclusión para participar en el proyecto de ellos se tomaron las respectivas muestras de sangre para su posterior estudio de laboratorio con los métodos descritos en los subsiguientes párrafos.

### 3.8.- Manejo del experimento

#### 3.8.1.- Recolección de muestras

Para la recolección de muestras se realizó el siguiente protocolo:

- Alistar los materiales que se van a utilizar.
- Toma de datos en la hoja de campo.
- Rotular el portaobjetos con el número de muestra.
- Sujeción del animal.
- Desinfección con alcohol etílico del área donde se va a realizar la punción.
- Toma de muestras de sangre por venopunción ,en la vena cefálica o pabellón auricular.
- Depositar una gota de sangre en el portaobjetos y realizar el frote periférico mediante la técnica de los dos portaobjetos.

#### 3.8.2- Frotis periférico: Técnica de los dos portaobjetos

- Depositar una pequeña gota de sangre en el extremo de un portaobjetos.
- Con el borde de otro portaobjetos a 45 grados, tocar la gota, esperar a que la sangre se distribuya por capilaridad y después deslizar suavemente un portaobjetos sobre el otro en sentido longitudinal hasta que la gota quede bien extendida sobre la superficie del primer portaobjetos.
- Secado del frotis al ambiente

Cuando la extensión se realiza por este procedimiento, el frotis presenta **tres zonas** diferenciadas, en las que la morfología eritrocitaria puede variar y la distribución de leucocitos puede ser diferente. La zona en que inicialmente se depositó la gota es excesivamente gruesa y no puede ser valorada adecuadamente. A continuación se extiende el de la extensión, que

corresponde a la región intermedia del frotis y en ella existe un reparto equilibrado de las células; es la zona ideal para la observación microscópica. Por último, al final de la extensión, se encuentran las o la, es una zona final dónde las células adoptan una disposición de cordones (Domínguez, 2011).

### **3.8.3.- Tinción Giemsa**

#### **3.8.3.1.- Procedimiento:**

- Cubrir la superficie del extendido durante 5 minutos con el alcohol metílico y eliminar el excedente (fijación química).
- Cubrir el preparado con solución Giemsa diluida (2 gotas de eosianato de azul de metileno por cada ml. de agua destilada) y dejar actuar durante 3 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Dejar secar el preparado al aire.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- RESULTADOS.

En el estudio efectuado se observó que de la población de 500 canes a los que se le realizó el análisis de laboratorio 57 presentaron cuadros compatibles con *ehrlichiosis spp.* que equivalen al 11% de la población total, en el 89% restante no se observaron la mórulas en los leucocitos (*ver gráfica y cuadro 1*)

<b>TABLA 1</b>				
<b>PREVALENCIA DE INCLUSIONES CITOPLASMÁTICAS DE <i>E. SPP.</i></b>				
<b>CANIDOS EN ESTUDIO</b>	<b>POSITIVOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>	<b>NEGATIVOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>500</b>	57	11%	443	89%

**GRAFICO N° 1**

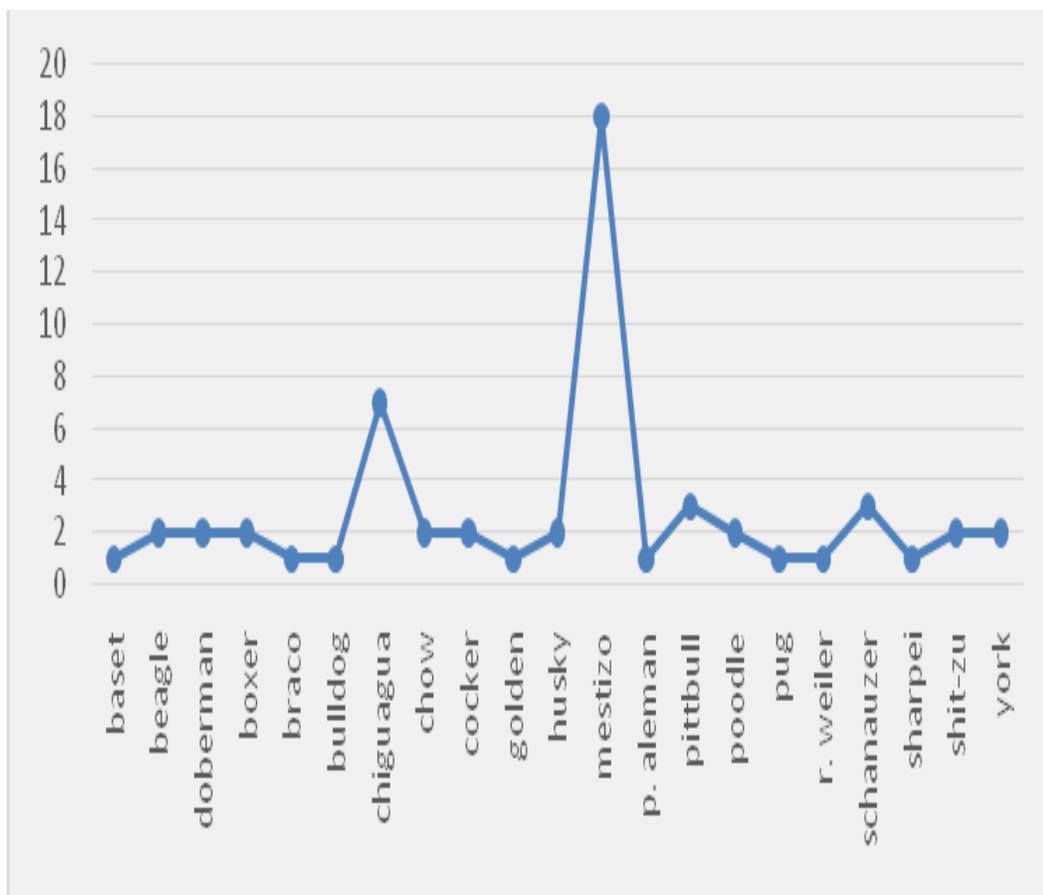
**PREVALENCIA DE INCLUSIONES CITOPLASMÁTICAS DE *E. SPP.***



<b>TABLA 2</b>	
<b>RAZAS POSITIVAS A E. SPP.</b>	
Baset	1
Beagle	2
Doberman	2
Boxer	2
Braco	1
Bulldog	1
Chiguagua	7
Chow	2
Cocker	2
Golden	1
Husky	2
Mestizo	18
P. Aleman	1
Pittbull	3
Poodle	2
Pug	1
R. Weiler	1
Schanauzer	3
Sharpei	1
Shit-zu	2
York	2

La raza con mayor frecuencia de pacientes positivos fue la MESTIZA con 18 canes infectados como lo explica la tabla N° 2 y el grafico n° 2, esto guarda relación con que por este sector es la raza con más presencia.

GRAFICO N° 2  
 RAZAS POSITIVAS A E. SPP.



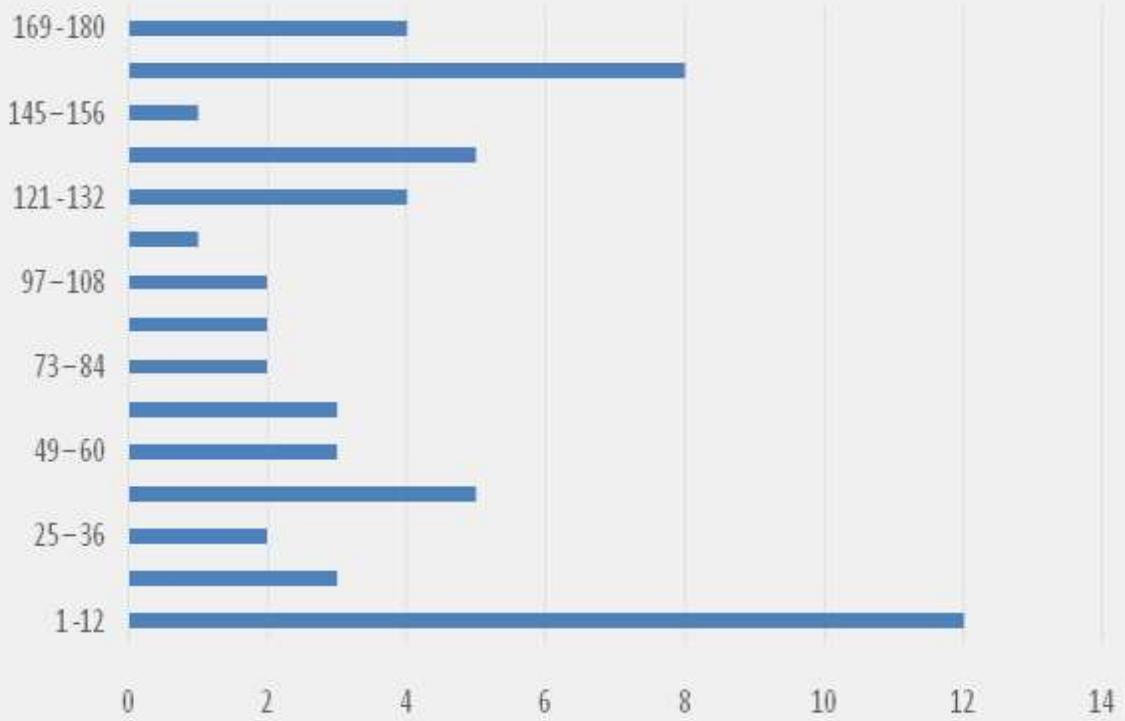
Se logró constatar que los canes 1 - 12 meses equivalente 21% y los de 157 a 168 meses esto es de 13 a 14 años correspondiente al 14% son los perros con una elevada cantidad de frecuencia, esto se debe a que en edades el

paciente tiene su sistema inmunológico deprimido lo que permite al hospedero y al agente causal penetrar con facilidad (Tabla 3; Grafico 3).

<b>TABLA N° 3</b>	
<b>FRECUENCIA DE CANES INFECTADOS POR EDADES EN MESES</b>	
<b>1 -12</b>	<b>12</b>
<b>13 – 24</b>	<b>3</b>
<b>25 – 36</b>	<b>2</b>
<b>37 – 48</b>	<b>5</b>
<b>49 – 60</b>	<b>3</b>
<b>61 – 72</b>	<b>3</b>
<b>73 – 84</b>	<b>2</b>
<b>85 – 96</b>	<b>2</b>
<b>97 – 108</b>	<b>2</b>
<b>109 – 120</b>	<b>1</b>
<b>121 - 132</b>	<b>4</b>
<b>133 – 144</b>	<b>5</b>
<b>145 – 156</b>	<b>1</b>
<b>157 - 168</b>	<b>8</b>
<b>169 - 180</b>	<b>4</b>

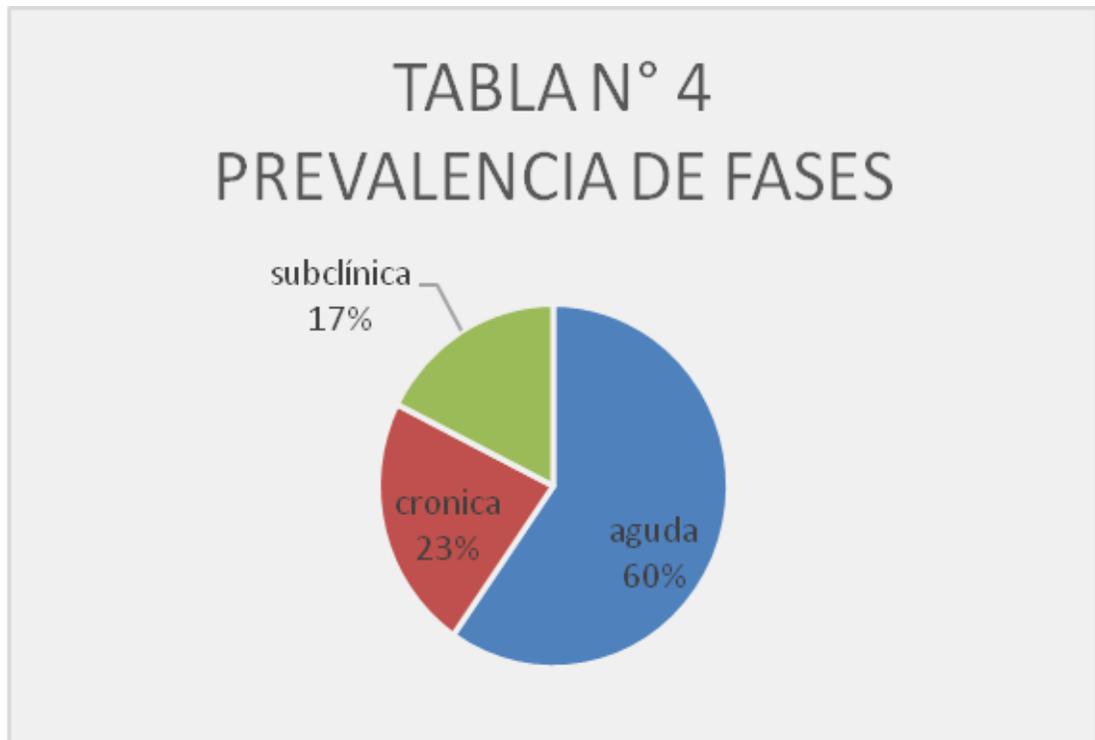
### GRAFICO N° 3

#### FRECUENCIA DE CANES INFECTADOS POR EDADES EN MESES



Como nos revela la tabla 4 y el gráfico 4 la fase aguda es la de mayor prevalencia en los perros objetos de estudio.

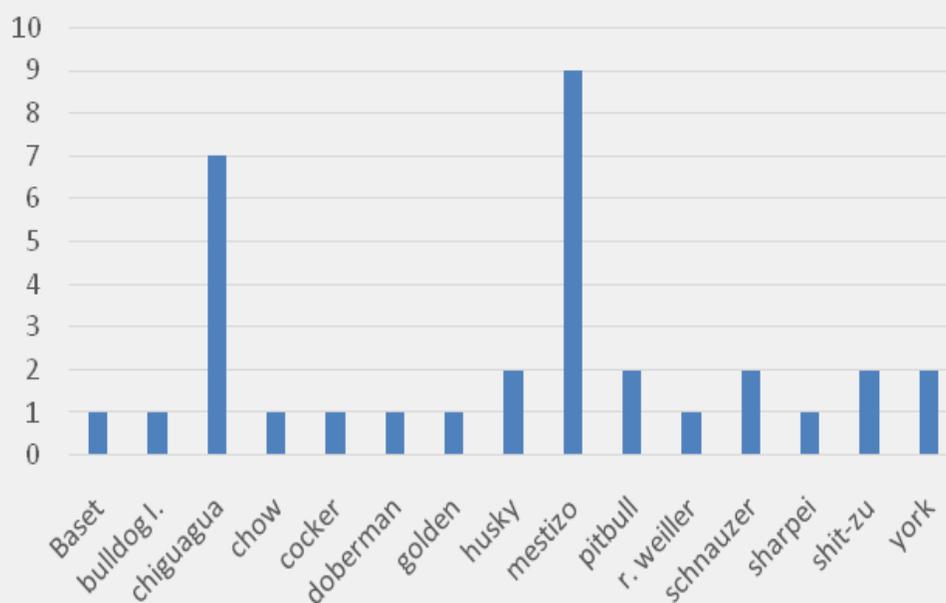
<b>TABLA 4</b>		
<b>PREVALENCIA DE FASES</b>		
<b>Fases</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Aguda</b>	34	60%
<b>Crónica</b>	13	23%
<b>Subclínica</b>	10	17%



En la fase aguda la raza que predomina es la mestiza con nueve casos seguida de la chiguagua con 7 casos.

<b>TABLA 5</b>	
<b>CASOS EN FASE AGUDA</b>	
<b>Baset</b>	<b>1</b>
<b>Bulldog i.</b>	<b>1</b>
<b>Chiguagua</b>	<b>7</b>
<b>Chow</b>	<b>1</b>
<b>Cocker</b>	<b>1</b>
<b>Doberman</b>	<b>1</b>
<b>Golden</b>	<b>1</b>
<b>Husky</b>	<b>2</b>
<b>Mestizo</b>	<b>9</b>
<b>Pitbull</b>	<b>2</b>
<b>R. Weiller</b>	<b>1</b>
<b>Schnauzer</b>	<b>2</b>
<b>Sharpei</b>	<b>1</b>
<b>Shit-zu</b>	<b>2</b>
<b>York</b>	<b>2</b>

## GRAFICO N°5 CASOS EN FASE AGUDA



De acuerdo a las edades los canes con mayor frecuencia de infección en la fase aguda son 1 a 12 meses con un número de 7 pacientes.

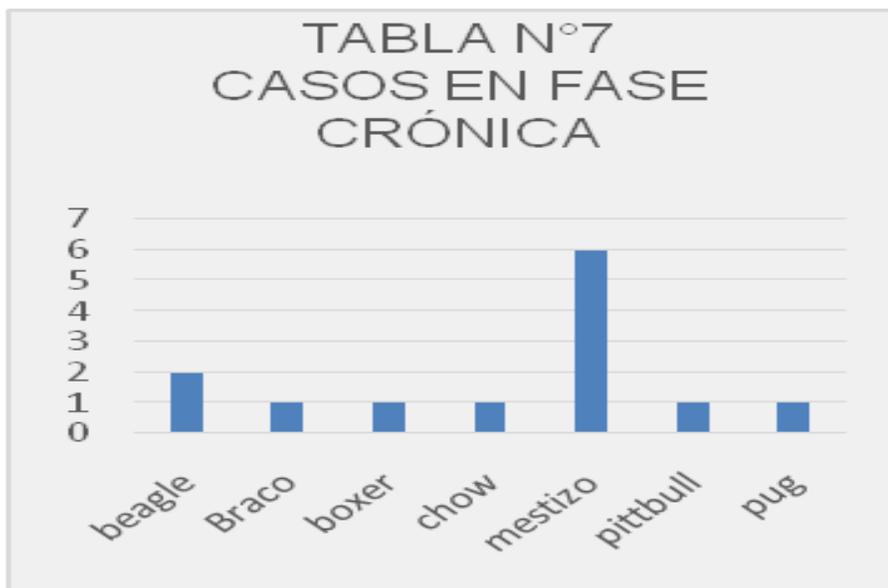
<b>TABLA 6</b>	
<b>CASOS EN FASE AGUDA POR EDADES</b>	
<b>1 -12</b>	<b>7</b>
<b>37 – 48</b>	<b>5</b>
<b>49 – 60</b>	<b>2</b>
<b>73 – 84</b>	<b>2</b>
<b>85 – 96</b>	<b>2</b>
<b>97 – 108</b>	<b>2</b>
<b>121 -132</b>	<b>3</b>
<b>133 144</b>	<b>4</b>
<b>157 -168</b>	<b>5</b>
<b>169 -180</b>	<b>2</b>

TABLA N°6  
CASOS EN FASE  
AGUDA POR EDADES



La raza mestiza para la fase crónica sigue presentando una prevalencia elevada como lo muestra la tabla y el grafico 7

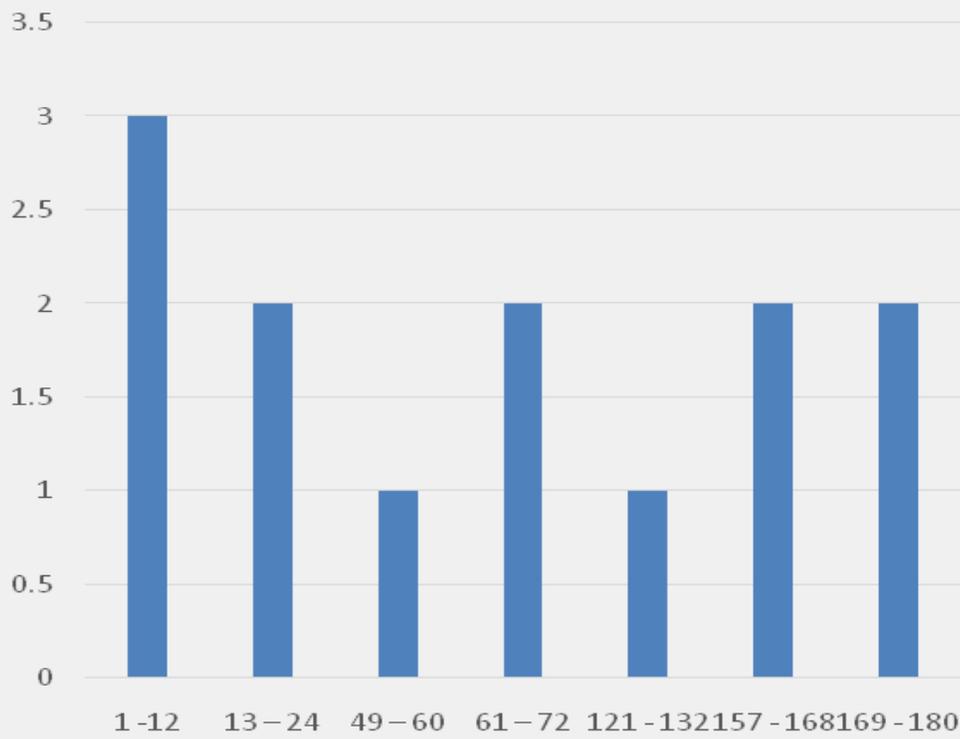
TABLA 7 CASOS EN FASE CRÓNICA	
Beagle	2
Braco	1
Boxer	1
Chow	1
Mestizo	6
Pittbull	1
Pug	1



Los perros de acuerdo al rango de edad más afectados en esta fase fueron los que se encontraban entre 1 a 12 meses, así se aprecia en la tabla y el gráfico 8.

<b>TABLA 8</b>	
<b>CANES EN FASE CRÓNICA POR EDADES</b>	
<b>1 -12</b>	<b>3</b>
<b>13 – 24</b>	<b>2</b>
<b>49 – 60</b>	<b>1</b>
<b>61 – 72</b>	<b>2</b>
<b>121 -132</b>	<b>1</b>
<b>157 -168</b>	<b>2</b>
<b>169 -180</b>	<b>2</b>

TABLA N° 8  
CANES EN FASE CRÓNICA POR  
EIDADES



Se presentaron 10 casos en la fase subclínica de los cuales el 3,30 % de la razas infectadas son mestizos, con respecto a las edades el 20% está ubicada en de 1 a 12 meses.

GRAFICO N° 9

CANES EN FASE SUBCLÍNICA POR RAZAS

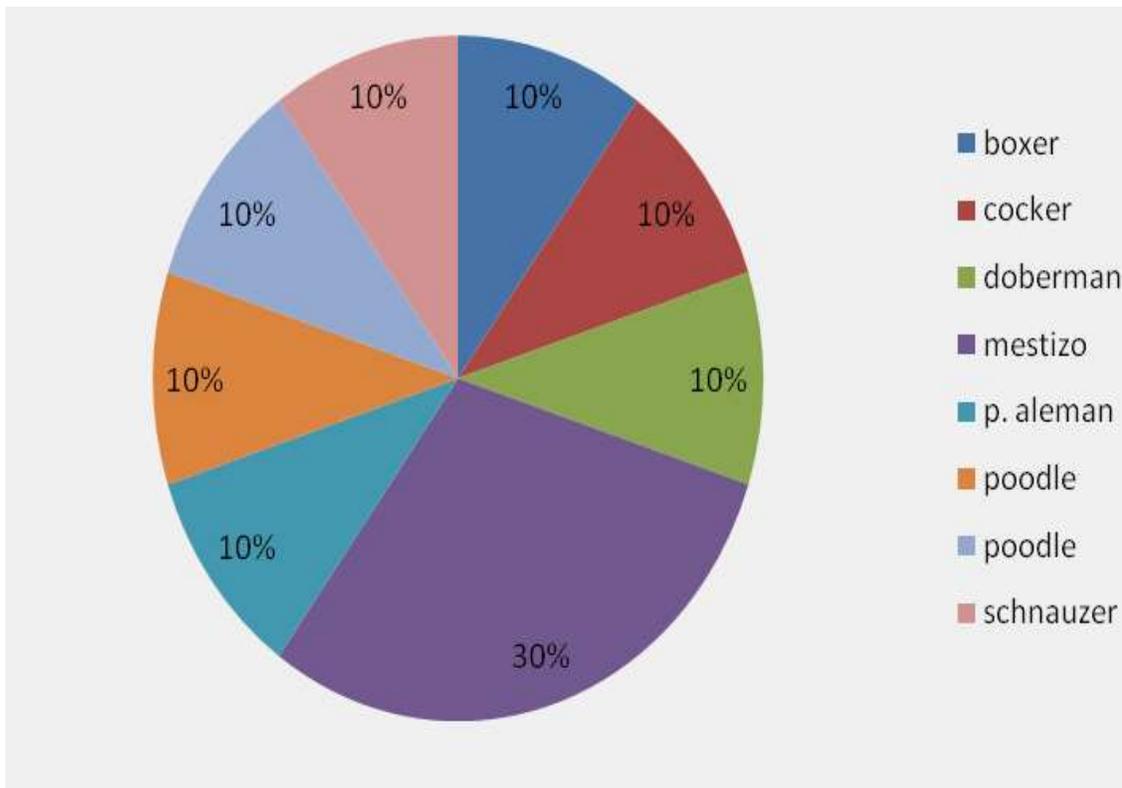
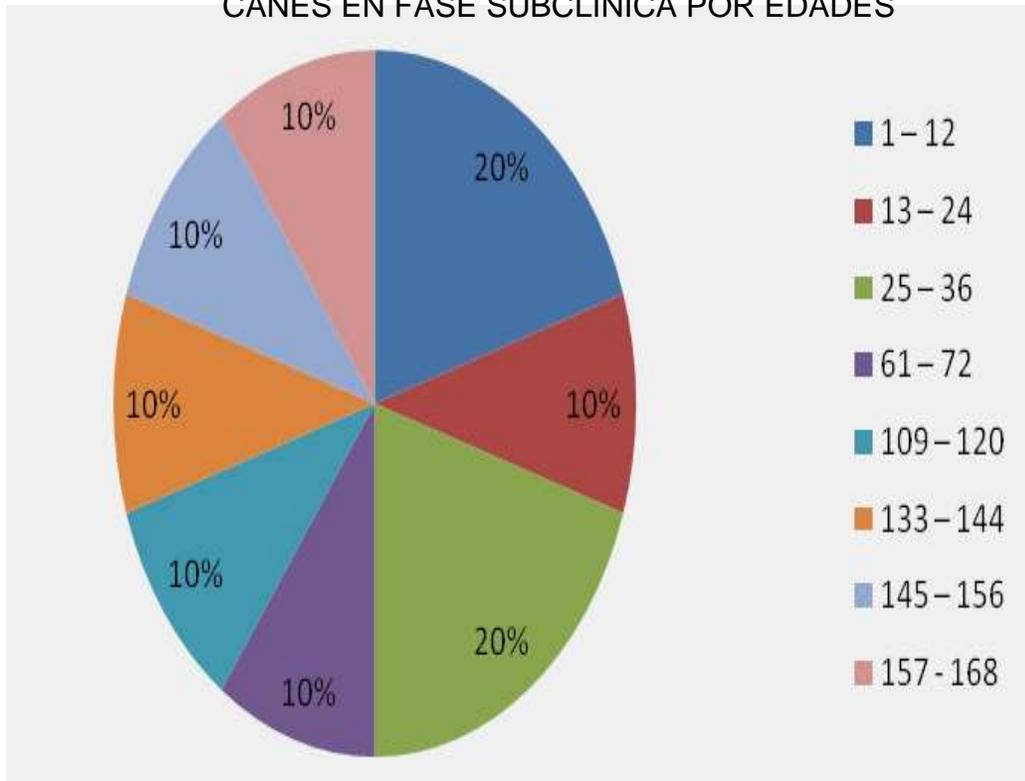


GRAFICO N° 9

CANES EN FASE SUBCLÍNICA POR EDADES



## 4.2.- DISCUSIÓN.

Pudimos verificar que el agente causal de la EMC bacteria gran negativa, ubicua, ya que se encuentra distribuida en casi todos los continentes donde habite el agente vector; En la ciudad de Guayaquil debido a su clima cálido, tropical y húmedo en invierno, lo vuelve propenso para la proliferación de la garrapata marrón (RS), y sumado a la falta de control por parte de sus propietarios se logró identificar en el presente estudio realizado a 500 canes de la población delimitada, obtuvimos una prevalencia de 57 canes, que corresponde al 11%, y 443 negativos que equivale al 89%.

La exploración física, demostró que el 59.64% se encontraba en fase aguda con los síntomas ya estudiados ampliamente en esta investigación, en el momento de la elaboración del frotis encontramos la presencia de la mórula de *E. spp.*

En la fase aguda, la más elevada, se evidenció los síntomas más comunes de la enfermedad es decir: fiebre, depresión, anorexia, petequias, epistaxis, signos neurológicos, edema escrotal y linfadenopatía, desprendimiento de retina, dolor articular, cojeras, signos neurológicos centrales y periféricos, mientras que en los canes en fase crónica, se observaron estados febriles y de decaimiento, Como lo menciona la bibliografía, en la fase sub-clínica los perros en estudio no presentaron signos de la enfermedad, sin embargo; al igual que en las otras fases existió presencia de la *rickettsia* en el frotis.

La fase sub-clínica es la más peligrosa, ya que puede durar hasta 3 años, según el estado inmunológico del paciente, los canes participantes del proyecto de 157 – 168 meses equivalentes de 13 a 14 años, ya son geriátricos y presentan debilidad en su sistema inmune, en esta fase los periodos febriles desaparecen y la mascota se convierte en un portador sano, los cuadros anémicos se van desarrollando lentamente y son anemias no regenerativas, ya que este parásito se aloja en la médula ósea, se hace hipoplásica.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1.- CONCLUSIONES.

De acuerdo a las metas planteadas podemos concluir, para el objetivo general se logró constatar la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en las 3 fases de la enfermedad a 57 canes de una población de 500 muestras.

Con respecto al objetivo 1 la población total de canes había presentado infestación por el agente vector (garrapata marrón del perro (*riphicephalus sanguineus*), por esta razón se decidió analizar las muestras sanguíneas de cada uno de ellos, pues como lo explica el marco teórico, la fase sub-clínica no presenta sintomatología, no obstante como mencionan las estadísticas, se pudo constatar que el 11% de los canes (57) donde se observó la mórula en la microscopia del frotis sanguíneo; 60% presento síntomas compatibles con la fase aguda; 23% síntomas correspondientes a la fase crónica, mientras que el 17% restantes al no presentar sintomatología física fueron clasificados dentro da la fase sub-clínica.

Concordando con lo explicado en el párrafo anterior y en la bibliografía; al ser la fase sub-clínica asintomática, se determinó que es necesario realizar exámenes de laboratorio para precisar el diagnóstico que permita un tratamiento con mayor efectividad, explicado lo planteado en el objetivo 2.

Cumpliendo con el objetivo 3, el universo de estudio ubicado al sur de la ciudad de Guayaquil, ciudad que como se ha recalcado tiene el clima favorable para el desarrollo del vector, la presencia de perros callejeros sin ningún control por parte de las autoridades municipales, la ausencia de programas de control de garrapatas que debería ser realizada por el departamento de Zoonosis de la Subdirección Provincial de Salud del Guayas y la poca cultura preventiva en los moradores del sector ha permitido una súper población de garrapatas, además de tener en cuenta en los 57 casos presentes no se ha visitado al veterinario y el propietario ha recurrido a la auto medicación.

## 5.2.- RECOMENDACIONES.

- Una vez que se ha concluido este trabajo de investigación, se realiza las siguientes recomendaciones:
- Es importante que los dueños practiquen el hábito de visitar al médico veterinario un periodo máximo de 4 veces al año, para realizar control de ectoparásitos y endoparásitos.
- El médico veterinario debe apoyarse en pruebas de laboratorio que confirmen su diagnóstico clínico y así realizar un plan de tratamiento a tiempo que permitirá un pronóstico favorable.
- Un cuidado adecuado y una alimentación balanceada recomendada por un profesional calificado, con el propósito de fortalecer el sistema inmunológico del can.
- No auto medicar a nuestras mascotas en caso de presentar alteraciones en la salud, es recomendable acudir al médico veterinario.
- Si bien es cierto los gobiernos municipales y estatales realizan campañas para el control de vectores se han enfocado en el mosquito, soslayando a la garrapata que de acuerdo a los estudios en Latinoamérica ubican a este artrópodo como el segundo transmisor de enfermedades al ser humano; Por lo tanto, resulta necesario concienciar a las autoridades a la implementación de programas cuya finalidad sea el control del *ripicephalus sanguieuss*.

- Al detectar la presencia del vector es imperante la fumigación cada 21 días con 2cc. cipermetrina o amitraz disuelto en 1 litro de agua, prestando mayor importancia a grietas, orificios, agujeros, áreas verdes, debajo de piedras, escombros y muebles.
- El médico veterinario debe orientar a los propietarios de sus pacientes sobre las secuelas que puede traer una infestación con garrapatas, advertirles sobre la posible zoonosis y guiarlo hacia una medicina preventiva.

## BIBLIOGRAFIA

ALMAO M; GARCÍA M; MUJICA R., (2013)., *Ehrlichia spp.* en el Caserio “La Isla”, municipio Palavecino, estado Lara. Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Barquisimeto, Estado Lara-Venezuela.

ARGOS PORTAL VETERINARIA, (2014)., Introducción a las garrapatas (I): consideraciones generales. Universidad de Zaragoza. [argos.portalveterinaria.com](http://argos.portalveterinaria.com)

ARGOS PORTAL VETERINARIA., (2014)., Diagnóstico y control de *ehrliquiosis/anaplasmosis* y garrapatas. [argos.portalveterinaria.com](http://argos.portalveterinaria.com)

BARRIOS L., (2010)., Evidencia serológica y hematológica de *Ehrlichia spp.*. En propietarios de canes domésticos con antecedentes de *Ehrlichiosis* en Lima Metropolitana. Tesis para optar el título de Médico Veterinarios. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. E.A.P. de Medicina Veterinaria. Lima – Perú.

CARRILLO L.; BETANCUR S.; ROLDÁN D.; MV; ESTEBAN J.; GALEANO D.; LOAIZA E.; GIRALDO C., (2012)., Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia spp.*, en canes de Medellín (Colombia). Implementação de um método baseado em PCR, para o diagnóstico de *Ehrlichia spp.*, em canes de Medellín (Colômbia). Grupo de Investigación VERICEL, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín-Colombia.

<http://www.ppelverdadero.com.ec/mi-guayaquil/item/ciudades-de-america-en-calles-del-barrio-del-seguro.html>

Tomada de la edición impresa del Sábado, 04 Febrero 2012

**Cinthia Herrera / Guayaquil**

CONSEJO EUROPEO PARA EL CONTROL DE LAS PARASITOSIS DE LOS ANIMALES DE COMPAÑÍA-ESCCAP (2012). Control de enfermedades transmitidas por Vectores en perros y Gatos. Guía ESCCAP Nº 5.

DAVOUST B., PARZY D., DEMONCHEAUX J.P., TINE R., DIARRA M., MARIÉD J.L., MEDIANNIKOV O., (2013). Usefulness of a rapid immuno-migration test for the detection of *canine monocytic ehrlichiosis* in Africa. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. ARTICLE IN PRESS, CIMID-947; No. of Pages 7. Edt. ELSEVIER.

DOLZ G.; ÁBREGO L.; ROMERO L.; CAMPOS L.; BOUZA L.; JIMÉNEZ A., (2013). Conferencias magistrales. *Ehrlichiosis y anaplasmosis* en Costa Rica. *Ehrlichiosis and anaplasmosis* in Costa Rica. *Acta Médica Costarricense On-line version* ISSN 0001-6012. *Acta méd. costarric* vol.55 suppl.1 San José Jul. 2013.

DOMÍNGUEZ G. G., (2011). Prevalencia e identificación de hemoparásitos (*ehrlichia spp.*, *babesia spp.* y *anaplasma phagocytophilum*) en perros de la ciudad de Cuenca. Tesis de grado previa a la obtención del título de médica veterinaria zootecnista. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca – Ecuador.

FERNÁNDEZ A.; GARCÍA C.; ANTONIO SAÉZ J.; VALDEZATE S., (2010)., Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.

GONZALES L.; Y LESMES L., (2013)., Determinación de *Babesia spp.* y *Ehrlichia spp.*, en hemolinfa de garrapatas teleoginas de *Rhipicephalus sanguineus*.

Determination of *Babesia spp.* and *Ehrlichia spp.* in tick hemolymph of *Rhipicephalus sanguineus* engorged. Laboratorio de Microbiología de la Universidad de los Llanos Orientales, ciudad de Villavicencio-Colombia.

HARRUS S., WANER T. (2011). Diagnosis of canine *monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia spp.)*: An overview. The Veterinary Journal. Edt. Elsevier. Israel.

HARRUS S., WANER T., (2013). *Canine Monocytic Ehrlichiosis – From Pathology to Clinical Manifestations*. Israel Institute for Biological Research, P.O. Box 19, Ness Ziona 74100, Israel. Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, P.O. Box 12, Rehovot 76100, Israel.

INMUNOLOGÍA. Curso 2009-10. Tema 4. Inmunidad innata. Mesp.mos de defensa inespecíficos. Fagocitosis. La respuesta inflamatoria. Inmunidad adaptativa. Inmunidad sistémica. Inmunidad de base humoral e Inmunidad de base celular. Principales características de la respuesta inmune.

LINARES M. (2011)., Hepatozoonosis canina en la provincia de Mendoza, Argentina Hallazgos clínicos y de laboratorio. Universidad Juan Agustín Maza. Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales.

MÁRQUEZ I., (2011). “Diagnóstico de enfermedades hemáticas en canes en la ciudad de Milagro mediante el uso de kits SNAP 4DX”, Tesis de grado previa a la obtención del título de médico veterinario zootecnista. Universidad de Guayaquil Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guayaquil-Ecuador.

MARTÍNEZ G., (2014). Diagnóstico Serológico y Citológico de *Ehrlichiosis* en Perros de la Ciudad de Morelia Michoacán”. Tesis de grado previa a la obtención del título de médica veterinaria zootecnista. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán-México.

MASAKE R. Y MUSOKE A., (2010)., Enfermedades hemoparasitarias y respuestas inmunitarias específicas. International Livestock Research Institute (ILRI), P.O. Box 30709, Nairobi, Kenia.

MATERLAB. (2013). Protocolos de Tinción. Madrid España

MUTZ I. (2010). Las infecciones emergentes transmitidas por garrapatas. Departamento de Niños y Adolescentes, Hospital Estatal de Leoben, Leoben, Austria. Ann Nestlé [Esp] 2009; 67:123–134 DOI: 10.1159/000287275.

NIETO JL. (2010) Práctica 15: Tinción Giemsa. [Internet]. Scribd Inc; [Acceso 2 de septiembre de 2010].

Disponible en: <[http://es.scribd.com/doc/49115405/Practica-15-Tinción de Giemsa](http://es.scribd.com/doc/49115405/Practica-15-Tinción%20de%20Giemsa)>

NORIEGA A., MVZ (2012). El Laboratorio Clínico en el diagnóstico de *Ehrlichiosis canina*. BioPet Laboratorio Veterinario, Artículo 2.

PAREDES K., (2010), “Determinación de la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia spp.* en perros atendidos en clínicas veterinarias del municipio de Soyapango, San Salvador, El Salvador en el período comprendido entre Noviembre 2008–Enero 2009”. Tesis presentada a la Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Veterinaria. Guatemala.

PAULINO A., (2001)., Detección serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia spp.* y *Ehrlichia Chaffeensis* en humanos que realizan actividades veterinarias en Lima Metropolitana. Tesis de grado previa a la obtención del título de médico veterinario zootecnista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. E.A.P. de Medicina Veterinaria. Lima – Perú.

QUIJADA J.; FORLANO M.; BETHENCOURT A.; GAHÓN D.; GONZÁLEZ D.; Y ISIS VIVAS I., (2013)., Ectoparásitos (*Acari: Ixodidae* y *Siphonaptera: Ctenicephalidae*) en canes bajo asistencia veterinaria en un Hospital Veterinario de Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIII, Nº 2, 105 - 110, 2013.

QUIROZ H.; FIGUEROA J.; IBARRA F.; LÓPEZ M.,(2011)., Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Primera edición, 02 de febrero de 2011,ISBN:978-607-00-4015-3 México.

ROMERO V., PADILLA S., ALVARADO N., (2011)., Cambios hematológicos en pacientes positivos a *ehrlichiosis canina* en la ciudad de Lázaro Cárdenas. XXII Encuentro de investigación veterinaria y producción animal. Trabajos de clínica veterinaria. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

ROMERO L.; DOLZ G. ; ROMERO J.; MENESES A.; JIMÉNEZ M. Y SALAZAR L., (2010). Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia spp.* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. Evaluation of the diagnosis of *Ehrlichia spp.* in dogs from Costa Rica, using blood smears and molecular technique. Rev. Ciencias Veterinarias, Vol. 28, N° 1, [23-36], ISSN: 0250-5649, enero-junio, 2010. Universidad de Costa Rica (UCR), San José-Costa Rica.

ROJAS A.; RUEDA A.; DÍAZ D.; MESA N.; BENAVIDES J.; IMBACHI K.; ALVARES L.; LÓPEZ R., (2013)., Identificación de *Ehrlichia spp.* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. Grupo de Investigación en Acarología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

SALAZAR H.; BURITICÁ E.; (2011)., Infección por *Ehrlichia spp.*: patogenia, diagnóstico y recomendaciones terapéuticas. Grupo de investigación en medicina y cirugía en pequeños animales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Tolima, Colombia.

SIGMA ALDRICH, (2013). Tinción de Wright Modificada, numero de catálogo (WS16-500ml; WS32-1L; WS80-2.5L; WS128-4L); 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. SIGMA-ALDRICH INTERNATIONAL GmbH Wassergasse 7900 St. Gallen Switzerland.

STEPHEN J.; BARBET A.; BEKKER C.; DASCH G.; PALMER G.; RAY S.; RIKIHISA Y  
RURANGIRWA F.(2001)., REORGANIZATI On of genera in the families  
*Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*:  
unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with  
*Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species  
combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HE agent" as  
subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. International Journal of  
Systematic and Evolutionary Microbiology (2001), 51, 2145-21 (55  
Printed in Great Britain).

WEINBORN R.; TORO I.; LEPORATI M.; CASTILLO D., (2012)., Hallazgos serológicos  
de *Ehrlichia spp.* en canes de la ciudad de Talca, Chile. Serologic  
findings of *ehrlichia spp.* in dogs in Talca, Chile. Hospitales Veterinarios  
vol. 4 N° 2 – 2012.

## ANEXOS

Anexo 1: Croquis de campo.



## Anexo 2: Presupuesto

<b>MATERIALES</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>VALOR</b>	<b>TOTAL</b>
Agujas hipodérmicas	5 cajas de 100 c/u	6.20	31.00
Guantes de examinación	1 caja	4.50	4.50
Portaobjetos	10 cajas	3.80	38.00
Mandil	3	12.00	36.00
Hojas de campo	500	0.05	25.00
Caja porta placas	10 cajas	3.80	38.00
Algodón	2 fundas	3.50	7.00
Alcohol metílico	2 litros	6.00	12.00
Microscopio	1	500.00	500.00
Cinta masking	1	0.90	0.90
Cámara para fotos	1	300.00	300.00
Hojas de laboratorio	500	0.05	25.00
Colorante de Giemsa	2 frascos	8.00	16.00
Aceite de inmersión	1 frasco	12.00	12.00
Agua destilada	1 galón	1.50	1.50
Computadora	1	700.00	700.00
Impresora	1	70.00	70.00
CDs	1	1.00	1.00
Memory flash	1	25.00	25.00
Esferográficos	5	0.50	2.50
Papel bond	1 resma	6.00	6.00
			<b>1.851.40</b>

