

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
División Regional de Ciencia Animal**



**“MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis*”**

**POR:**

**GABRIELA ALEJANDRA CARDIEL PINEDA**

**MONOGRAFIA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Torreón, Coahuila, México.**

**Septiembre de 2012.**

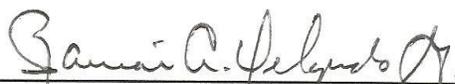
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
División Regional de Ciencia Animal**

**MONOGRAFIA**

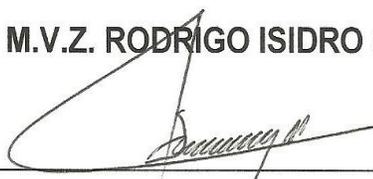
**“Métodos de diagnóstico de *Ehrlichia canis*”**

**APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN**

**ASESOR PRINCIPAL**

  
**M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ**

**M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO**

  
**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal**

**Torreón, Coahuila, México.**

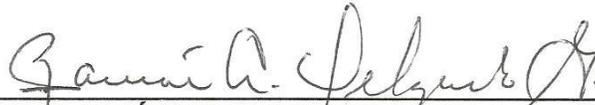
**Septiembre de 2012.**

**“Métodos de diagnóstico de *Ehrlichia canis*”**

MONOGRAFIA ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL  
COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA Y APROBADA COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

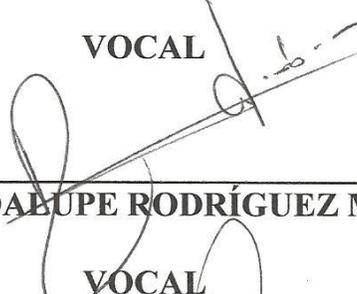
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESIDENTE**



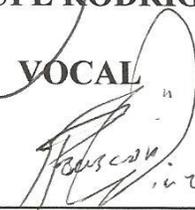
**M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ**

**VOCAL**



**M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**

**VOCAL**



**M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ**

**VOCAL SUPLENTE**



**M.V.Z. ERIC ALEJANDRO REYES RAMÍREZ**

**Torreón, Coahuila, México.**

**Septiembre de 2012.**

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente monografía es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas. Definitivamente este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración ellas,

En primer lugar quiero agradecerte a ti Dios, por permitirme concluir este proyecto además de darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad.

Además, quiero brindar un sincero agradecimiento a mi asesor M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ, por su apoyo, tiempo, paciencia y amabilidad además por ser buen maestro que a lo largo de la carrera, gracias por los retos que me puso en el camino, haciéndome saber que siempre hay motivos por los que uno puede aferrarse.

No puedo pasar por alto a mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo durante mi carrera y especialmente en este proceso con quienes pase buenos momentos de mi formación como estudiante y persona. Porque nunca alcanza el tiempo, el papel o la memoria para mencionar o dar con justicia todos los créditos y méritos a quienes se lo merecen.

Partiendo de esta necesidad y diciendo de antemano a todos ellos:

MUCHAS GRACIAS.

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo a mi familia por brindarme su apoyo, con su impulso, fuerza y tenacidad, especialmente a mis padres que me vieron nacer y crecer, tener dolorosos fracasos y grandiosas victorias, por ellos simplemente ahora soy quien soy.

También a mis amigos que siempre estuvieron a mi lado y me dieron su afecto y sincera amistad en momentos estresantes, felices y tristes.

Una dedicatoria diferente e importante para mis mascotas, que me han acompañado a lo largo de mi vida y que gracias a ellas decidí estudiar medicina veterinaria e iniciar este proyecto.

## CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| AGRADECIMIENTOS .....  | I         |
| DEDICATORIA .....  | II        |
| CONTENIDO.....   | III       |
| RESUMEN .....  | V         |
| <b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>                                   | <b>1</b>  |
| <b>2.- HISTORIA.....</b>                                       | <b>2</b>  |
| <b>3.- DISTRIBUCIÓN ACTUAL .....</b>                           | <b>2</b>  |
| <b>4.- ETIOLOGÍA.....</b>                                      | <b>3</b>  |
| <b>4.1. Características de Ehrlichia .....</b>                 | <b>3</b>  |
| <b>4.2. Enfermedades causadas por ehrlichias.....</b>          | <b>5</b>  |
| <b>4.3.- Vector <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....</b>      | <b>8</b>  |
| <b>4.3.1 Taxonomía y morfología .....</b>                      | <b>8</b>  |
| <b>4.3.2. Ciclo de vida.....</b>                               | <b>10</b> |
| <b>4.2.3 Alimentación .....</b>                                | <b>11</b> |
| <b>4.2.4. Fijación .....</b>                                   | <b>12</b> |
| <b>4.2.5 Apareamiento.....</b>                                 | <b>13</b> |
| <b>5.- PATOGENIA .....</b>                                     | <b>14</b> |
| <b>6.- RESPUESTA INMUNE A LA ENFERMEDAD.....</b>               | <b>16</b> |
| <b>6.1. Respuesta inmune en fase aguda.....</b>                | <b>16</b> |
| <b>a) Inmunidad humoral.....</b>                               | <b>17</b> |
| <b>b) Inmunidad celular .....</b>                              | <b>18</b> |
| <b>6.2. Respuesta inmune en fase subclínica.....</b>           | <b>18</b> |
| <b>6.3. Vulnerabilidad inmune ligada a la cronicidad .....</b> | <b>19</b> |
| <b>7.- MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO .....</b>                        | <b>20</b> |
| <b>7.1 Diagnostico clínico .....</b>                           | <b>20</b> |
| <b>a) Signos clínicos en fase aguda.....</b>                   | <b>20</b> |
| <b>b) Signos clínicos en fase subclínica.....</b>              | <b>22</b> |
| <b>c) Signos clínicos en fase crónica .....</b>                | <b>23</b> |
| <b>d) Diagnostico diferencial.....</b>                         | <b>25</b> |
| <b>7.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....</b>                       | <b>26</b> |
| <b>a) Microscopia de luz-frotis.....</b>                       | <b>26</b> |

|   |    |
|---|----|
| b) Examen hematológico .....                                | 27 |
| c) Bioquímica sanguínea .....                               | 27 |
| d) Análisis de orina.....                                   | 28 |
| e) Pruebas serológicas.....                                 | 28 |
| 1. Inmunofluorescencia.....                                 | 28 |
| 2. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ..... | 30 |
| f) Pruebas moleculares.....                                 | 31 |
| 1. Reacción en cadena de la polimerasa .....                | 31 |
| g) Diagnostico histopatológico .....                        | 34 |
| h) Paquetes comerciales.....                                | 35 |
| 8.- TRATAMIENTO.....  | 35 |
| 9.- EVOLUCIÓN POST TRATAMIENTO.....                         | 38 |
| 10.- PROFILAXIS.....  | 39 |
| 11.- INMUNIZACIÓN .....                                     | 40 |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <a href="#">Figura 1. Ehrlichia en célula monocítica.....</a>                                      | 5  |
| <a href="#">Figura 2. Ehrlichia en célula granulocítica.....</a>                                   | 5  |
| <a href="#">Figura 3.- morfología de R. sanguineus.....</a>  | 10 |
| <a href="#">Figura 4.- ciclo de vida de Rh. Sanguineus .....</a>                                   | 11 |
| <a href="#">Figura 5.- Áreas de fijación predilectas de Rh. Sanguineus en perros. ....</a>         | 13 |
| <a href="#">Figura 6.- hemorragias cutáneas puntiformes (petequias) en región costoadominal. .</a> | 25 |
| <a href="#">Figura 7.- hemorragias cutáneas (eritema) en región inguinal.....</a>                  | 25 |
| <a href="#">Figura 8. Variantes de la prueba de inmunofluorescencia .....</a>                      | 29 |

## INDICE DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| <a href="#">Cuadro 1. Especies de Ehrlichia que infectan personas y animales domésticos o de laboratorio</a> | 6  |
| <a href="#">Cuadro 2.- Genogrupos de las especies ehrlichiales.....</a>                                      | 7  |
| <a href="#">Cuadro 3.- Taxonomía de las garrapatas .....</a>   | 9  |
| <a href="#">Cuadro 4.- Resumen de la patogenia de la ehrlichiosis canina.....</a>                            | 16 |

## RESUMEN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad infectocontagiosa de curso agudo, subclínico o crónico. La ehrlichiosis canina es causada por bacterias pertenecientes al orden *Rickettsiales*, éstas representan bacterias intracelulares obligadas que residen en las vacuolas de las células eucariotas, con potencial para causar enfermedades mortales transmitidas por garrapatas en los seres humanos y varias especies de mamíferos. La transmisión *E. canis* se produce a través de agentes vectores (*Rhipicephalus sanguineus*). La prevalencia de la enfermedad depende de la presencia del vector, tiene distribución mundial y ha sido reconocida durante muchos años en México, incluyendo la Comarca Lagunera. Los métodos de diagnóstico de una infección por *Ehrlichia canis* son muy variables, siendo la de SNAP 4Dx la más frecuentemente utilizada en la actualidad. Pueden ser métodos visuales, serológicos y moleculares. Tetraciclina oral y oxitetraciclina inyectable ambos son los fármacos de elección para el tratamiento de las enfermedades causadas por *rickettsias*. El principal objetivo del tratamiento profiláctico debe ir encaminado a evitar la alimentación de la garrapata.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus*, métodos de diagnóstico, SNAP 4Dx.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad infectocontagiosa de curso agudo, subclínico o crónico, la cual es causada por una bacteria intracelular obligada, Gram negativa, que requiere de un mamífero como reservorio y de un artrópodo (*Rhipicephalus sanguineus*) como vector. Esta enfermedad afecta a perros y es transmitida por la picadura de una garrapata. Durante 1935, en Algeria, Donatien y Lestoquard describieron por primera vez *Ehrlichia canis*, aunque fue denominada *Rickettsia canis*. Fue renombrada hasta 1945 como *Ehrlichia canis* en honor a Paul Ehrlich. Actualmente este género comprende cinco especies, de las cuales *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii* tienen la capacidad de causar enfermedad en caninos y humanos.<sup>(7)</sup>

La ehrlichiosis canina también es conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi, pancitopenia tropical, tifus canino, fiebre hemorrágica canina y síndrome hemorrágico idiopático.<sup>(17)</sup>

Ehrlichiosis es un nombre genérico para las infecciones causadas por bacterias intracelulares obligadas de la familia *Anaplasmataceae*, principalmente en los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*.<sup>(6)</sup>

La prevalencia de la enfermedad depende de la presencia del vector, tiene distribución mundial y ha sido reconocida durante muchos años en México, incluyendo la Comarca Lagunera, el tratamiento de la enfermedad es específico para las rickettsias y los métodos de diagnóstico muy variables, siendo la de SNAP 4Dx la más frecuentemente utilizada en la actualidad, por tal motivo la finalidad de la presente monografía es conocer diferentes técnicas de diagnóstico de la erliquiosis canina.

## 2.- HISTORIA

El primer agente erliquial fue observado en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935, quienes identificaron un microorganismo *Rickettsia* en monocito de caninos que cursaba con una enfermedad que ocasionaba pancitopenia severa, el cual fue denominado *Rickettsia canis*, para luego ser renombrado en 1945 como *Ehrlichia canis* (*E. canis*) en honor al bacteriólogo Paul Ehrlich. <sup>(11)</sup>

En 1955, se produjo en Japón un síndrome aparentemente producido por un agente erliquial, que afectaba a humanos, conocido como “Fiebre del Sennetsu”, semejante a la mononucleosis. Al agente causal se le asigno el nombre científico de *Ehrlichia sennetsu* (actualmente *Neorickettsiasennetsu*). Esta enfermedad también está presente en Malasia. En los Estados Unidos fue reconocida por primera vez la *E. canis* en 1962 y a finales de los 60's se definió el rol patogénico significativo de esta especie, cuando se pudo establecer su participación etiológica en la enfermedad llamada “pancitopenia tropical canina”. En 1978 fue identificada por primera vez la *Ehrlichia platys*, actualmente denominada *Anaplasmaplatys*. En los Estados Unidos se diagnosticó por primera vez la erliquiosis monocítica humana (EMH) en 1986, causada por *E. chaffeensis*, mientras que en 1994 se descubrió la erliquiosis granulocítica humana (EGH), causada por un agente similar o idéntico a *E. equi*, que provoca la erliquiosis granulocítica equina y a la *Ehrlichia phagocytophilum*, que produce la enfermedad en ovinos y bovinos. El agente causal de EGH *E. equi* y *E. phagocytophilum* actualmente son una misma especie denominada *Anaplasmaphagocytophilum*.<sup>(6)</sup>

## 3.- DISTRIBUCIÓN ACTUAL

La distribución de la ehrlichiosis está relacionada con la distribución del vector *Rhipicephalus Sanguineus*, se ha descrito su ocurrencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América. <sup>(17)</sup>

Alrededor de 74 especies reconocidas del genero *Rhipicephalus* de las cuales la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sea la más ampliamente distribuida e importante en el mundo por su preferencia hacia los perros como hospedadores, se encuentra entre las latitudes 50°N y 42°S. <sup>(27)</sup>

Garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, vectores de (*E. canis*), también son comunes en los climas cálidos del sur de EE.UU., debido en parte a su origen tropical o mediterráneo y la intolerancia general de las bajas temperaturas. Debido a que esta garrapata puede sobrevivir dentro de las viviendas donde los perros están presentes, *R. sanguineus* se considera ahora que es endémica en todos los EE.UU. con una mayor prevalencia en ciertas regiones geográficas. La garrapata marrón del perro se sabe que también transmite otros agentes patógenos a los perros en América del Norte, incluyendo *Bartonellavinsoniisubsp. Berkhoffii*, *Rickettsiarickettsii*, *canis*, *Babesia*, *canis Hepatozoon*, y *Anaplasmaplatys*. <sup>(1)</sup>

## 4.- ETIOLOGÍA

### 4.1. Características de Ehrlichia

Las erliquias son bacterias pertenecientes al orden Rickettsiales, éstas representan bacterias intracelulares obligadas que residen en las vacuolas de las células eucariotas, con potencial para causar enfermedades mortales transmitidas por garrapatas en los seres humanos y varias especies de mamíferos. <sup>(28)</sup>

Los microorganismos rickettsiales pertenecen al *Reino Proteobacteria*, clasificadas como alfa-proteobacterias Gram negativas, grupo que incluye un gran número de agentes oligotrofos (capaces de crecer en niveles bajos de

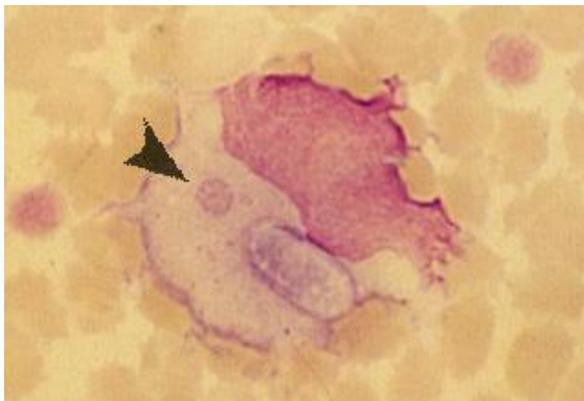
nutrientes). Dentro de este Reino se encuentran también los géneros *Escherichia*, *Nesseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Vibrio*.<sup>(29)</sup>

Recientes estudios genéticos reorganizaron algunas especies en orden Rickettsiales, entre las familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae*. En base a estos estudios, los tres organismos, anteriormente conocida como *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* y el agente HGE (granulocítica humana ehrlichiosis), se unificaron en una sola especie y trasladó al género *Anaplasma*. Estos tres organismos son reclasificados como *Anaplasma phagocytophilum*, la causal agente de la anaplasmosis granulocítica, una enfermedad emergente transmitida por garrapatas. *A. phagocytophilum* se ha detectado en todo el mundo, particularmente en América del Norte y Europa, así como en Sudáfrica, América del Sur, y Asia, sino que afecta a los humanos, caballos, rumiantes, gatos, perros, y una variedad de especies de vida silvestre, incluyendo roedores, ciervos, y carnívoros. Los signos clínicos de infección, aunque difieren con la especie de huésped y la virulencia, son fiebre, anorexia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, signos neurológicos, inflamación hepática, abortos, e incluso víctimas mortales en un pequeño porcentaje de los mamíferos.<sup>(28)</sup>

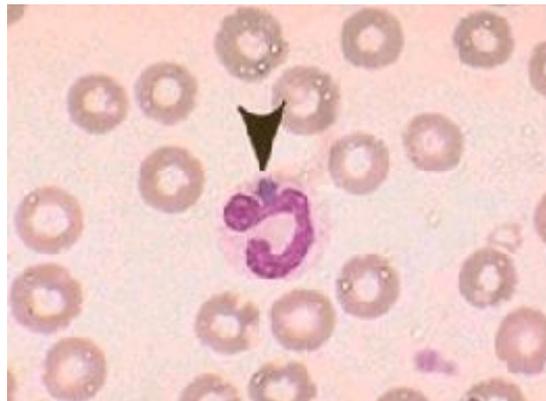
*Ehrlichia* es pleomórfico, cocoide, aeróbico, no crece en medios bacteriológicos estándares y mide de 0,5 a 1.5 micras. *E. canis* es Intracelular obligada tanto en el hospedero vertebrado como en el vector invertebrado. Se reproducen por fisión binaria al igual que la mayoría de las bacterias. Presenta tropismo por células sanguíneas (monocitos, granulocitos o plaquetas) de animales y seres humanos. Es transmitida por garrapatas. Las especies que infectan a los perros en general, incluyen *E. canis*, *E. equi*, *E. risticii*, *E. platys* y *E. ewingi*.<sup>(14)</sup>

## 4.2. Enfermedades causadas por ehrlichias

Las enfermedades causadas por estos patógenos tradicionalmente habían sido clasificadas por el tipo de células blanco más comúnmente infectadas. Por ejemplo, *E chaffeensis* y *E canis* residen principalmente en los monocitos (figura 1), y la enfermedad causada por estos agentes con frecuencia se llama ehrlichiosis monocítica (figura 2). (Cuadro 1). Actualmente las enfermedades ehrlichiales se clasifican por genogrupos, contrayéndose un árbol filogenético (cuadro 2). La importancia clínica de esta nueva clasificación es que tal vez los veterinarios se enteren pronto de nuevos agentes rickettsiales y las enfermedades que causan. <sup>(20)</sup>



**Figura 1. Ehrlichia en célula monocítica.**



**Figura 2. Ehrlichia en célula granulocítica.**

**Cuadro 1. Especies de *Ehrlichia* que infectan personas y animales domésticos o de laboratorio**

| <b>Especie (Enfermedades)</b>                             | <b>Distribución Geográfica</b> | <b>Vector</b>  | <b>Leucocitos Infectados</b>                   | <b>Huésped infectado en forma natural</b>  | <b>Huésped infectado Experimentalmente</b>                 |
|---|--------------------------------|--|--|--|--|
| Monocítica  |                                |  |  |  |  |
| <i>E. canis</i><br>(Erlíquiosis monocítica canina)        | Mundial, tropical y templado   | <i>Rhipicephalus sanguineus</i>                                | Células mononucleares, linfocitos              | Canidae                                    | Ninguno  |
| <i>E. chaffeensis</i><br>(ehrlichiosis monocítica humana) | EUA (principalmente el sur)    | <i>Amblyomma americanum</i> ,<br><i>Dermacentor variabilis</i> | Células mononucleares, neutrófilos, linfocitos | Humanos, perros, venados                   | Perros, venado de cola blanca, ratones de pata blanca      |
| Agente de la ehrlichiosis humana venezolana               | Venezuela                      | Incierto   | Células mononucleares                          | Humanos, perros?                           | Ratones  |
| <i>E. sennetsu</i><br>(fiebre sennetsu)                   | Occidente de Japón, Malasia    | Incierto   | Células mononucleares                          | Humanos                                    | Ratones, perros, primates no humanos                       |
| <i>E. risticii</i><br>(ehrlichiosis monocítica equina)    | EUA, Canadá                    | Incierto   | Monocitos                                      | Caballos                                   | Perros, gatos, ratones, primates no humanos                |
| <i>E. risticii</i><br>(subespecie <i>atypicalis</i> )     | EUA                            | Incierto   | Monocitos, células cebadas, enterocitos        | Perros                                     | Incierto   |
| <i>E. bovis</i><br>(ehrlichiosis bovina)                  | Medio Oriente, África          | Especies de <i>Hyalomma</i> , especies de <i>Rhipicephalus</i> | Monocitos, macrófagos                          | Ganado                                     | Incierto   |
| Granulocítica   |                                |  |  |  |  |
| <i>E. ewingii</i><br>(ehrlichiosis granulocítica canina)  | EUA                            | Incierto   | Neutrófilos, eosinófilos                       | Perros                                     | Incierto   |
| <i>E. equi</i><br>(ehrlichiosis granulocítica canina)     | EUA (costa occidental)         | <i>Ixodes pacificus</i>  | Neutrófilos, eosinófilos                       | Caballos, perros, humanos, llamas          | Burros, ovejas, perros, cabras, gatos, primates no humanos |
| Agente de la ehrlichiosis granulocítica humana            | EUA                            | <i>I. scapularis</i> (norte)                                   | Neutrófilos                                    | Humanos, caballos, perros, ratones de pata | Ratones, venados   |

|  |                                    |                      |   |   |                  |
|--|------------------------------------|----------------------|---|---|------------------|
|  |                                    |                      |   | blanca, ardillas listadas, ratones campestres             |                  |
| <i>E. phagocytophila</i> (fiebre transmitida por garrapata)  | Gran Bretaña, Europa, África, Asia | <i>I. ricinus</i>    | Neutrófilos, eosinófilos, monocitos           | Ovejas, ganado, visones, perros, venados, llamas, humanos | Cobayos, ratones |
| Trombocítica   |                                    |                      |   |   |                  |
| <i>E. platys</i> (trombocitopenia cíclica infecciosa canina) | Sur de EUA, sur de Europa          | <i>R. sanguineus</i> | Plaquetas                                     | Perros  | Perros           |
| Otros  |                                    |                      |   |   |                  |
| <i>Cowdriarumantium</i> (hidropericardio)                    | África sub-Sahara                  | <i>A. hebraeum</i>   | Células endoteliales, macrófagos, neutrófilos | Ganado  | Perros           |

**Cuadro 2.- Genogrupos de las especies ehrlichiales**

| Genogrupo | Género               | Miembros  | Características  |
|-----------|----------------------|---|--|
| 1         | <i>Ehrlichia</i>     | <i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>E. muris</i> , <i>E. ewingii</i> , <i>E. ruminantium</i>                                     | Forman grandes mórulas con muchas bacterias a menudo suspendidas en una matriz fibrilar, encontrándose las mitocondrias y el retículo endoplasmático de la célula infectada en agregados muy cercanos a la mórula, incluso en contacto con su membrana |
| 2         | <i>Anaplasma</i>     | <i>E. equi</i> , <i>E. phagocytophilum</i> , agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH), <i>E. platys</i> , <i>A. marginale</i> | Este género presenta mórulas no fibrilares y las mitocondrias así como el retículo endoplasmático no contactan con la membrana de la mórula.   |
| 3         | <i>Neorickettsia</i> | <i>E. sennetsu</i> , <i>E. risticii</i> , el agente   | Estas especies se desarrollan en pequeñas vacuolas individuales ue no  |

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
|   |  | de<br><i>Stellantchasmusfalcatatus</i> (agente SF) aislado del gusano <i>S. falcatatus</i> (parasito de peces) y <i>Neorickettsiahelmitheca</i> . | se funden unas con otras, dividiéndose junto con los organismos ehrlichiales. |
| 4 | <i>Wolbachia</i> spp y simbiontes severos de insectos. |   | Se desconoce si causan enfermedad en vertebrados.                             |

Como ya se ha señalado, la transmisión *E. canis* se produce a través de agentes vectores, garrapatas de la familia *Ixodidae* genero *Rhipicephalus* especie *Rhipicephalus sanguineus*.<sup>(22)</sup>

#### **4.3.- Vector *Rhipicephalus sanguineus***

##### **4.3.1 Taxonomía y morfología**

Los artrópodos parásitos son un grupo importante, no sólo por su biodiversidad, sino también por su presencia en explotaciones pecuarias, así como en los animales de compañía, los cuales generalmente son intradomiciliarios en poblaciones rurales, suburbanas y aún en las ciudades modernas. Dentro de estos destacan las garrapatas (cuadro 3), parásitos externos (ectoparásitos obligatorios) chupadores de sangre de la mayoría de los vertebrados terrestres y extremadamente adaptables, poseen un exoesqueleto duro que recubre su cuerpo segmentado y todas en estado adulto poseen patas en número par.<sup>(22)</sup>

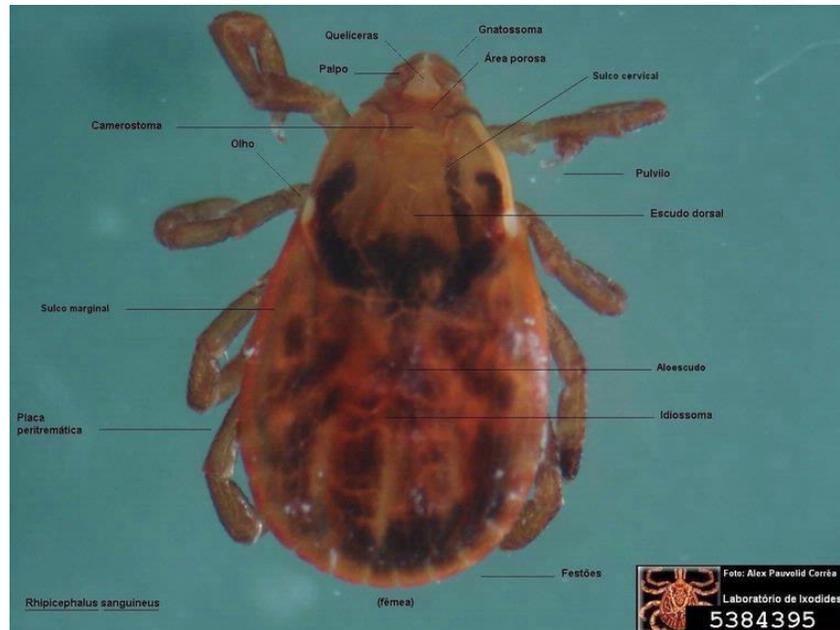
### Cuadro 3.- Taxonomía de las garrapatas

|            |                       |                  |                        |
|------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| Reino      | <i>Animalia</i>       |                  |                        |
| Filo       | <i>Arthropoda</i>     |                  |                        |
| Clase      | <i>Arachnida</i>      |                  |                        |
| Subclase   | <i>Acari</i>          |                  |                        |
| Superorden | <i>Parasitiformes</i> |                  |                        |
| orden      | <i>Metastigmata</i>   |                  |                        |
| Familia    | <i>Ixodidae</i>       | <i>Argasidae</i> | <i>Nuttalliellidae</i> |

*Rhipicephalus sanguineus* presenta un escudo o caparazón dorsal. Este escudo cubre toda la superficie dorsal del macho y solo la porción dorsal anterior de las hembras, ninfas y larvas. El escudo de las hembras mantiene su tamaño reducido cuando el cuerpo de las mismas se va hinchando por lo que cubre una proporción progresivamente decreciente de la superficie dorsal a medida que se van alimentando, convirtiéndose en un simple punto en las hembras atiborradas de sangre y siendo apreciable con mayor claridad mirando el ejemplar desde delante que desde atrás. A cada lado del escudo en localización opuesta al segundo par de patas se encuentra una zona oval clara, "el ojo". Lo que parece ser una cabeza es simplemente una serie de piezas bucales articuladas sobre un segmento basado. Estas son un hipostoma, dos quelíceros y dos palpos articulados en la base del capitulum. El aparato completo se denomina capitulum. El hipostoma está armado con dientes curvos y sirven para permitir el anclaje de la garrapata. Los quelíceros están dispuestos a lo largo de las líneas de las pinzas dentadas y presentan denticulos móviles en sus puntas, denominados quelas, los cuales sirven para perforar el orificio en el que la garrapata introduce el hipostoma. Los palpos son estructuras sensoriales que permanecen en la superficie de la piel. Los machos de *Rhipicephalus Sanguineus* tienen uno o dos pares de placas prominentes a ambos lados del ano. El borde posterior del cuerpo está adornado por series regulares de áreas

rectangulares denominados festones por su similitud a una guirnalda decorativa de las que se cuelgan formando curvas entre dos puntos (figura 2).<sup>(25)</sup>

**Figura 3.- morfología de *R. sanguineus***



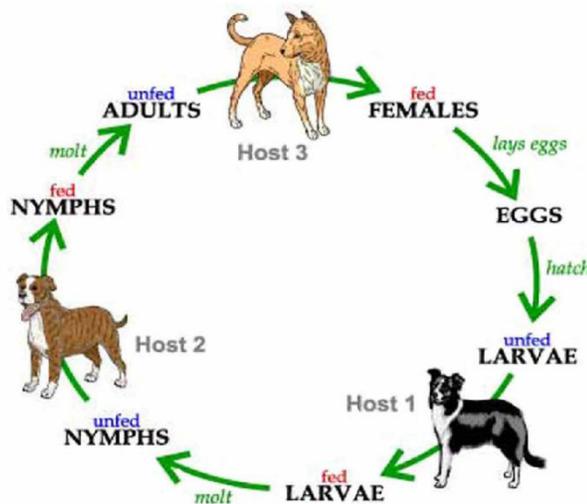
#### **4.3.2. Ciclo de vida**

Los ácaros en general tienen estados de desarrollo bien definidos que son: huevo, larva, ninfa y adulto, separados por mudas. Por ello, muchas garrapatas tienen un ciclo vital de tres huéspedes y cada estado activo (larva, ninfa y adulto), abandona al huésped para mudar y alcanzar el siguiente.<sup>(22)</sup>

Cada etapa debe buscar un anfitrión (figura 3), en un entorno doméstico esto puede resultar en la alimentación en el mismo perro (si hay sólo uno o varios perros), pero hay una oportunidad de que la misma garrapata se alimente de tres anfitriones diferentes.<sup>(5)</sup>

La hembra adulta después de alimentarse abandona al hospedador y luego de cuatro o cinco días en el suelo pone de 2000 a 4000 huevos, estos evolucionan en un periodo de 17 y 30 días, es necesario que pase un perro

para que la larva, suba, se alimenta tres o cuatro días y baja al suelo, paredes, escombros, etc, se transforma en metalarva y luego a ninfa, aquí busca al segundo huésped, sube y se alimenta tres o cuatro días y baja nuevamente, a las paredes, suelo y escombros, etc, y mudan a metaninfas donde se diferencian en machos y hembras, buscan al tercer huésped, suben, se alimenta durante cinco o seis días se produce la copula y abandona al huésped, esta es al hembra que baja y pone huevos, reiniciando el ciclo, el cual dura en total dos y tres meses depende de los estadios móviles, es decir larvas, ninfas y adultos, que pueden tener largos periodos de sobrevivencia en ayunas (larva 253 días, ninfa 183 días, adulto 568 días). Las características del ciclo de vida de las garrapatas le permiten diseminarse muy rápido y mantenerse por mucho tiempo en un lugar aun en ausencia de animales. <sup>(25)</sup>



**Figura 4.- ciclo de vida de *Rh. Sanguineus***

#### 4.2.3 Alimentación

Una vez en el perro, *Rh. sanguineus* utiliza sus quelíceros para perforar la piel del anfitrión y luego inserta su hipostoma y quelíceros en la epidermis del huésped, en ocasiones alcanza las capas superiores de la dermis. La garrapata ingresa los patógenos en su organismo al alimentarse de un hospedador

infectado, éstos llegan al epitelio intestinal y penetran en la cavidad corporal de la garrapata (el hemocele) acompañados del agua y de los iones en exceso que son aprovechados por las glándulas salivares para formar la saliva que será de nuevo inoculada, en ese o en otro hospedador, permitiendo la transmisión de los agentes infecciosos ingeridos con la comida. Existe una transmisión transtadial de los patógenos vehiculizados por las garrapatas, de tal manera que una infección adquirida en el estadio de ninfa se mantendrá hasta el adulto, pudiendo infectar a más de un huésped a lo largo de su desarrollo. La transmisión transovárica, desde la garrapata hembra a su progenie, no juega un papel importante en la transmisión natural de las enfermedades ehrlichiales. Las garrapatas macho pueden tomar la sangre de múltiples las comidas. De hecho, se ha demostrado que las garrapatas machos previamente unidos a un perro pueden pasar a otro cohospedero perro y se alimentan de él. Además, las garrapatas machos pueden permanecer durante largos períodos de tiempo en el anfitrión. Los adultos de *R. sanguineus* son capaces de sobrevivir sin alimentarse hasta 568 días y pueden transmitir *E. canis* hasta 155 días tras haberla ingerido, lo que nos muestra su gran potencial, aunque no exista transmisión transovárica del patógeno, tanto como vector tanto como reservorio.

(6)

#### 4.2.4. Fijación

Las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* garrapatas pueden fijarse en todo el cuerpo del perro, pero la cabeza (sobre todo en las orejas), espacios interdigitales, espalda, región inguinal, y la axila (Figura 4) se encuentran entre sus sitios de unión preferidos. Aunque las garrapatas *Rhipicephalus* tienen un hipostomacorto y se fijan de manera más superficial, en comparación con otras garrapatas (por ejemplo, la mayoría de las especies de *Amblyomma* e *Ixodes*), pueden adherirse firmemente a la piel del huésped. Durante la fijación, la garrapata segrega una sustancia similar al cemento, que forma un cono en la superficie de la epidermis que se extiende hasta el estrato córneo. (5)

#### 4.2.5 Apareamiento

*Rh. Sanguineus* alcanza la madurez sexual y se aparea únicamente en el anfitrión. Aunque la hembra puede comenzar a alimentar incluso en ausencia de un macho, no va a ser completamente congestionada a menos que se apareen. En efecto, la ingestión de sangre es un importante estímulo para la espermatogénesis en los machos y de la ovogénesis en las hembras. Durante el apareamiento, el macho se sube el dorso de la hembra y se arrastra a su superficie ventral, de pie en la yuxtaposición (vientre a vientre) con ella. Entonces, el macho estimula la abertura genital femenina (gonoporo), mediante la inserción de las puntas de su quelíceros en ella. Poco después, el macho transfiere el espermatóforo (una doble pared, el saco lleno de espermias) a la apertura genital de la hembra con la ayuda de sus partes de la boca. El espermatóforo luego se fija en el tracto genital de la hembra. Alrededor de 24 horas después de la cópula, una cápsula completa de espermatozoides maduros (spermiophores) se encuentran en el *seminisreceptaculum* de las hembras copuladas. <sup>(6)</sup>



**Figura 5.- Áreas de fijación predilectas de *Rh. Sanguineus* en perros.**

#### 4.2.6 Importancia en la salud pública

Las garrapatas son vectores de enfermedades transmisibles a los animales y los seres humanos. Se considera que las garrapatas están sólo por

detrás de los mosquitos como vectores de enfermedades humanas. Son parásitos obligados, y mientras se alimentan pueden transmitir una amplia gama de agentes patógenos, como bacterias, espiroquetas, rickettsias, protozoos, virus, nematodos, y las toxinas. <sup>(29)</sup>

Las enfermedades transmitidas por garrapatas más comunes de transmisión a los seres humanos incluyen la enfermedad de Lyme, ehrlichiosis, babesiosis, la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, la fiebre de Colorado, tularemia, fiebre Q, parálisis por garrapatas, la fiebre manchada y la encefalitis. Las garrapatas también pueden facilitar las infecciones secundarias, y las proteínas en la saliva pueden desarrollar reacciones alérgicas. Las garrapatas pueden ser un riesgo zoonótico, ya que, no sólo pueden ser encontrados al aire libre, sino también en los hogares, en los que pueden entrar en contacto con los seres humanos, mientras que la búsqueda de condiciones ambientales favorables para subsistir. <sup>(29)</sup>

## **5.- PATOGENIA**

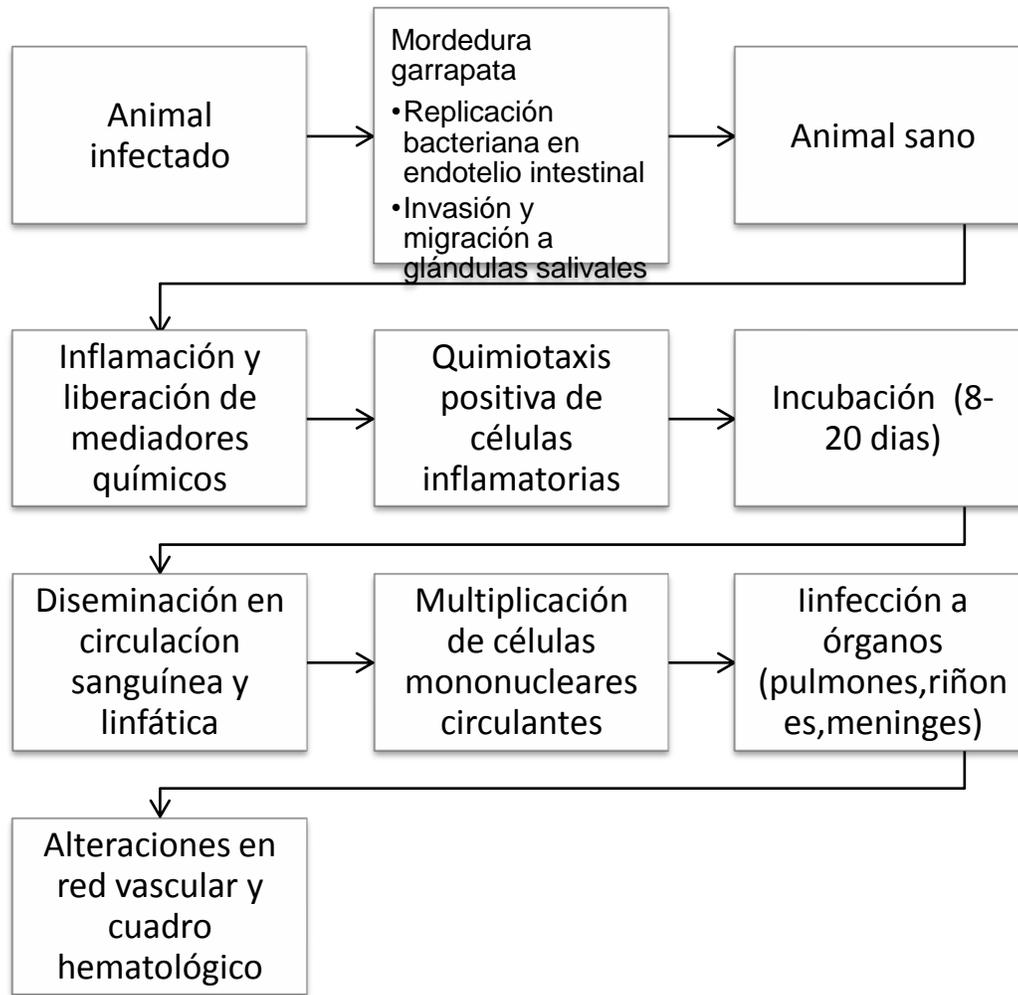
Los agentes patógenos de los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* se transmiten por ixódidos que inicialmente se alimentan de un animal infectado y, a continuación, después de la transmisión interhospedador, se alimentan de un humano o animal sensible. Esta transmisión refleja un desarrollo complejo dentro de la garrapata. Tras la adquisición inicial por alimentación y la ingestión de la harina de sangre en el lumen del intestino medio, la bacteria entra en el intestino medio del epitelio células y sufre una primera ronda de replicación dentro de una vacuola unida a la membrana. Esto es seguido por la invasión y migración hacia glándulas salivales. Una segunda ronda de la replicación en las células acinares de las glándulas salivales, al parecer depende de la reanudación de la alimentación de las garrapatas en un huésped mamífero, es seguida por la transmisión a través de la saliva. Aunque este ciclo de desarrollo básico es ampliamente conservado por *Anaplasma* y *Ehrlichia spp.*, También

es evidente que no todas las cepas de los patógenos tienen la misma eficiencia al realizar la transmisión. <sup>(17)</sup>

La infección por *Ehrlichia spp.* se produce tras la picadura del hospedador por una garrapata hematófaga. La propia picadura provoca inflamación y liberación de mediadores químicos que, a su vez, producen una quimiotaxis positiva de células inflamatorias. Este efecto inflamatorio favorece la infección por *Ehrlichia spp.*, ya que cuanto mayor sea el número de granulocitos o monocitos/macrófagos en el punto de inoculación, mayor probabilidad de infectar estas células. Tras un periodo de incubación que, según diversos estudios, puede variar de ocho a veinte días, se produce la diseminación de los agentes ehrlichiales por la circulación sanguínea y linfática. El potencial patogénico del organismo se ve favorecido por la movilidad de los macrófagos que pueden diseminar la infección por todo el organismo. <sup>(11)</sup>

Una vez que llega al torrente sanguíneo, *Ehrlichia canis* se multiplica en células mononucleares circulantes, las células infectadas son transportadas vía sanguínea a otros órganos, especialmente pulmones, riñones y meninges produciendo una serie de alteraciones fundamentalmente en la red vascular y el cuadro hematológico (cuadro 4). En las células infectadas se adhieren al endotelio, produciendo vasculitis e infección en el tejido subendotelial. Se presenta una trombocitopenia en los animales infectados debido a un mayor consumo, secuestro y destrucción de plaquetas. La anemia observada en algunos casos se debe a una supresión en la producción de eritrocitos y mayor destrucción de éstos, siendo el número de leucocitos variable. <sup>(13)</sup>

**Cuadro 4.- Resumen de la patogenia de la ehrlichiosis canina**



## **6.- RESPUESTA INMUNE A LA ENFERMEDAD**

El cuadro clínico y las lesiones generadas en el curso de la ehrlichiosis son consecuencia directa tanto de la propia infección bacteriana, como de la respuesta inmune desencadenada por el hospedador. La excesiva producción de anticuerpos en presencia de una respuesta celular disminuida tiene un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad. <sup>(1)</sup>

### **6.1. Respuesta inmune en fase aguda**

Muchos hallazgos sostienen la idea que la respuesta inmune juega un papel muy importante en la patogénesis de la ehrlichiosis monocítica canina aguda (EMC). La fiebre y algunos signos clínicos inespecíficos (depresión, anorexia) observados en los perros infectados son causados por el incremento en la producción de interleucina-1 (IL-1) por células presentadoras de antígeno, células B o por productos pirógenos exógenos de la bacteria. <sup>(16)</sup>

La activación de células T fue propuesta en la patogénesis de la EMC, siendo necesaria en la interacción de la respuesta humoral y celular para una efectiva destrucción de la bacteria. Posteriormente, se sugirió que la respuesta celular es el más importante componente del sistema inmune que provee protección contra *E. canis*. La respuesta inmune humoral al parecer no juega un rol importante en la protección contra *E. canis* e inversamente ha sido propuesta como contribuyente de la patogénesis de la enfermedad. <sup>(11)</sup>

#### **a) Inmunidad humoral**

La inmunidad humoral está mediada por linfocitos B. Cada linfocito B está programado para elaborar un único tipo de anticuerpo, que coloca en su superficie externa para que actúe como receptor. Cuando un antígeno penetra en el organismo, se unirá a aquellos receptores (anticuerpos) en los que encaje bien. Los linfocitos B, cuyos receptores han fijado antígeno, reciben una señal y se convierten en células plasmáticas, capaces de producir numerosos anticuerpos idénticos a aquel que portaban en su superficie. A su vez, los linfocitos B sufren un proceso de expansión clonal, multiplicándose en elevado número para elaborar anticuerpos específicos para ese antígeno en suficiente cantidad. Los anticuerpos pueden inactivar antígenos extracelulares o recubrir patógenos bacterianos marcándolos para su posterior destrucción por células del tipo NK. La vida intracelular de las bacterias es un mecanismo protector frente a los anticuerpos, que carecen de poder de penetración al interior de las células. Por ello la respuesta inmune de tipo celular es el mecanismo defensivo

por excelencia, aunque no exclusivo, frente a bacterias intracelulares obligadas.<sup>(16)</sup>

Una de las causas de la intensa respuesta humoral generada por las distintas especies ehrlichiales podría ser esta capacidad de recombinación génica, que permitiría al agente causal variar los epitopos superficiales inmunogénicos para evitar las defensas del hospedador e inducir la producción de numerosos anticuerpos y la persistencia de la infección.<sup>(11)</sup>

### **b) Inmunidad celular**

Las células T, las citoquinas solubles y las células NK son los principales responsables de la protección frente a las infecciones por patógenos intracelulares. Para la activación de células T, estas necesitan contactar con el antígeno que portan las células presentadoras de antígeno (monocitos y macrófagos) en su superficie. Para ello tiene un receptor antígeno-específico (TCR) como parte integrante de su membrana celular. Para reconocer el antígeno, los linfocitos T necesitan que éste sea presentado en la superficie de una célula acompañado de un marcador de superficie celular que informa al linfocito T de estar haciendo contacto con dicha célula.<sup>(16)</sup>

Se ha determinado la importancia de los linfocitos T CD8+ los cuales se incrementan en la sangre periférica de perros infectados con *E. canis*. El incremento de los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales (Natural killer) ocurre durante la infección como consecuencia de la citotoxicidad mediada por células.<sup>(11)</sup>

## **6.2. Respuesta inmune en fase subclínica**

Actualmente, no se han realizado muchos trabajos utilizando modelos animales (roedores), para obtener mayor información acerca de la ehrlichiosis subclínica o fase persistente. Para *E. canis* la inmunidad protectora es mantenida primariamente vía la respuesta inmune celular antes que la

respuesta inmune humoral, siendo la respuesta humoral la que predomina en esta etapa. La etapa subclínica puede ocurrir en perros infectados con *E. canis* de manera natural o en animales infectados después de un corto periodo de tratamiento antibiótico insuficiente. <sup>(16)</sup>

Debido a que el IFN-gamma es crucial para la eliminación en la etapa aguda de los agentes ehrlichiales, *E. chaffeensis* es capaz de establecer una infección persistente (periodo subclínico) en ratones experimentalmente infectados con el gen CMH-II noqueado, en otras palabras con la activación de células T CD4+ anulada. <sup>(11)</sup>

El cese de la actividad de replicación de las ehrlichias arrestadas en el bazo y médula ósea principalmente, permite que no se desencadene respuesta celular alguna, es decir el organismo no identifica al patógeno intracelular, lo que persiste es la producción inespecífica de anticuerpos, en otras palabras el sistema ha quedado marcado para producir anticuerpos antiplaquetarios, antiehrlichiales y antieritrocíticos, lo cuales mantienen las alteraciones hematológicas (trombocitopenia y anemia hemolítica). <sup>(11)</sup>

### **6.3. Vulnerabilidad inmune ligada a la cronicidad**

Las condiciones para presentarse la fase crónica no están bien comprendidas aun, pero se cree que así como en la etapa aguda y subclínica el estado inmunológico del animal tenga gran importancia para la manifestación de esta etapa. Así también, factores como susceptibilidad racial, condiciones de stress, coinfecciones con otros parásitos, localización geográfica, la especie del agente o constantes reinfecciones en el animal pueden estar involucrados. <sup>(1)</sup>

En esta etapa de la enfermedad se presenta daño medular, principalmente cuadros de aplasia medular en los casos graves. Esta lesión crónica a nivel de médula ósea es probable que sea producto del depósito de inmunocomplejos, así como de la destrucción de las células precursoras sanguíneas por parte del sistema inmune. De este modo, se destruyen

lentamente las células hematopoyéticas, cuyo estímulo induzca la proliferación de tejido fibroso. <sup>(11)</sup>

Se desconocen aun los mecanismos inmunológicos en esta etapa de la enfermedad, pero se sospecha que las respuestas celular y humoral están seriamente afectadas debido a la depleción de las poblaciones celulares circulantes. Se sabe que los anticuerpos circulantes en las últimas etapas de la fase crónica tienden a caer a niveles muy bajos. Esto podría entenderse como una reacción debido a la ausencia de células productoras de anticuerpos. <sup>(16)</sup>

## **7.- MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de una infección por *Ehrlichiaspp.* puede realizarse utilizando métodos visuales, serológicas y moleculares. Ehrlichiosis canina es una enfermedad potencialmente fatal, y el diagnóstico no se puede hacer en base a los signos clínicos o serológicos resultados por sí solos. Los signos clínicos pueden variar entre diferentes áreas geográficas regiones, y la serología no distingue entre infección actual y una exposición previa a la Ehrlichia, mientras que PCR puede indicar una infección activa. Por lo tanto, la evaluación de las manifestaciones clínicas, la evaluación serológica y molecular las pruebas son muy importantes para el diagnóstico preciso de ehrlichiosis. <sup>(16)</sup>

### **7.1 Diagnostico clínico**

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) se presenta en las fases agudas, subclínicas y crónicas, y esta infección puede causar una amplia gamma de signos clínicos, que varían incluso dentro y entre distintas localidades geográficas, esto depende tanto de la dosis infectante, raza del perro infectado, el estado inmunológico al momento de la infección, como de otras enfermedades concomitantes. <sup>(1)</sup>

#### **a) Signos clínicos en fase aguda**

La EMC aguda comienza aproximadamente 10 días post-infección (dpi) con *E. canis* y la sintomatología suele ser poco específica, puede involucrar anemia, anorexia o apetito caprichoso, ataxia, conjuntivitis, depresión, fiebre, pancitopenia, secreción ocular y vómitos, apatía, decaimiento, pérdida de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia. También puede aparecer edema de extremidades o de escroto, con signos clínicos durante 20 a 30 dpi. <sup>(11)</sup>

Otro signo incluye hemorragias. Las hemorragias en la infección (petequias y equimosis en piel y mucosa, hematuria, melena, hemorragias retinianas o conjuntivales, además de la epistaxis, siendo este último el más frecuente), se consideran signos típicos de la enfermedad ocurren sobre todo debido a la disminución en el recuento de plaquetas sumado a una inhibición en la agregación plaquetaria debido al desarrollo de anticuerpos contra las glucoproteínas propias de las plaquetas. <sup>(16)</sup>

Además se presenta dolor muscular severo de cuello y espalda, tos. Hay hepatomegalia. Si no se diagnostica la enfermedad en fase aguda, esta progresa a la fase subclínica en la que solo se encuentran alteraciones laboratoriales. En algunos casos los signos pueden ser muy leves, pasando prácticamente desapercibidos. <sup>(27)</sup>

Las manifestaciones respiratorias, oculares y cutáneas suelen ser más habituales en la fase crónica, aunque también se han descrito en la fase aguda. Estas manifestaciones respiratorias se caracterizan por la presentación de exudado mucopurulento acompañado en ocasiones de disnea y tos. La disnea puede también ser debida a la existencia de anemia severa. Los signos oftalmológicos suelen ser más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad, habiéndose descrito uveítis anterior, fotofobia, conjuntivitis, opacidad corneal e hipema. Más raramente se puede presentar retinitis difusa, desprendimiento de retina, hemorragia subretiniana y neuritis óptica. Se ha descrito también la aparición de ceguera aguda en casos de ehrlichiosis monocítica canina. Estos cuadros oftalmológicos graves parecen estar asociados a la

hiperviscosidad sanguínea secundaria a la gammapatía monoclonal presente en algunos casos de ehrlichiosis. Si bien la única sintomatología cutánea relacionada con la ehrlichiosis hasta hace poco tiempo era la aparición de equimosis y petequias, Sainz en 1996 describe una incidencia relativamente elevada de problemas cutáneos asociados a la ehrlichiosis, que pueden variar desde la mala calidad del pelo hasta la aparición de dermatitis alopécicas con eritema y descamación que remiten tras el tratamiento. <sup>(16)</sup>

Los signos neurológicos, que pueden ser ocasionados por meningitis debida a trastornos inflamatorios (meningitis linfoplasmocítica) o por hemorragias en sistema nervioso. Los signos mas frecuentes son convulsiones, ataxia, estupor y síndrome de neurona motora superior o inferior, disfunción vestibular aguda central o periférica. En algunos casos se ha observado mórulas en células del LCR. <sup>(11)</sup>

El daño renal es evidente, además los riñones son altamente sensibles a las vasculitis inmunomediadas por el depósito de complejos inmunes en el glomérulo produciendo consecuentemente glomerulonefritis, similar a la que se presenta en la leishmaniosis, la que conlleva a la insuficiencia renal aguda, presentándose signos característicos, tales como proteinuria y azotemia. Esta ultima debido a los niveles elevados de NUS y creatinina en la sangre. <sup>(16)</sup>

## **b) Signos clínicos en fase subclínica**

Tras la fase aguda de la ehrlichiosis, los animales pasan a un estado subclínico que puede establecerse durante años y en el que, en ausencia de sintomatología clínica, el agente permanece en órganos como bazo y médula ósea. La **fase subclínica** de la enfermedad aparece a las 6-9 semanas de la infección y puede durar de 1 mes a 5 años. Esta fase se caracteriza por ausencia de sintomatología con o sin presencia de alteraciones hematológicas (como anemia, trombocitopenia y leucopenia) y por títulos elevados de anticuerpos humorales. Durante esta fase pueden ocurrir tres supuestos: los

animales se recuperan espontáneamente, son tratados y eliminan la infección o pasan a la fase crónica de la enfermedad. No se conocen muy bien los mecanismos o factores que transforman infecciones subclínicas en un estado crónico. <sup>(11)</sup>

### **c) Signos clínicos en fase crónica**

Las condiciones por las que se desarrolla la **fase crónica** de la infección son desconocidas y pueden estar relacionadas con la raza, el estado inmunitario del individuo, condiciones de estrés, coinfección con otros parásitos o reinfecciones persistentes. Factores individuales de los pacientes asociados con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad clínica, probablemente relacionados con su sistema inmune, deben ser determinados todavía. <sup>(1)</sup>

Parece ser que situaciones de estrés o de inmunosupresión son capaces de desencadenar un cuadro clínico tras una prolongada fase subclínica. Sin embargo, en el curso de infecciones experimentales y durante la fase aguda de la enfermedad, un estado de inmunosupresión ni previene ni modifica significativamente las manifestaciones clínicas de la ehrlichiosis. <sup>(16)</sup>

La participación de mecanismos inmunomediados en la patogenia de la enfermedad es, si cabe, más acusado en la fase crónica de la misma. La gravedad de la fase crónica se ha asociado a la trombocitopenia y al grado de aplasia medular. La hipoplasia de médula ósea observada en fases crónicas puede ser el resultado de la infección persistente que promueve el fallo o supresión de las células madre pluripotenciales y puede estar inmunológicamente mediada, habiéndose observado infiltrados plasmocitarios en la médula ósea. <sup>(11)</sup>

En casos crónicos es posible observar signos clínicos inespecíficos, como en el trastorno agudo. Además, las tendencias hemorrágicas, la linfadenopatía, la esplenomegalia, las anomalías oculares y las infecciones secundarias se consideran indicadores de ehrlichiosis crónica. <sup>(16)</sup>

La epistaxis se observa en un 50% de los casos en esta fase y es considerada como distintivo de la enfermedad. La tendencia hemorrágica reflejada a nivel de mucosas, retina, piel abdominal o en cualquier otro órgano, es una secuela común de la infección crónica pronunciada debido al persistente número bajo de plaquetas circulantes (figura 5 y 6).<sup>(11)</sup>

Otros síntomas que se pueden presentar, con menor frecuencia en la fase crónica, son de tipo neurológico (ataxia, síndromes de neurona motora superior e inferior, hiperestesia generalizada, polineuropatía periférica, e incluso convulsiones), digestivo (hematemesis y de sangre en heces, más recientemente se han descrito procesos diarreicos de intestino grueso), locomotor (cojeras intermitentes con marcha rígida secundaria a poliartropatía. La enfermedad articular puede ocurrir por hemartrosis o depósito de complejos inmunitarios con la consiguiente artritis y derrame neutrofílico en la articulación, casi todos los casos de poliartritis se han relacionado con la infección por *E. ewingii*), urinario (glomerulopatía inmuno mediada que produce una insuficiencia renal) y reproductor (hemorragias petequiales en mucosa genital y edema de escroto. En hembras se ha asociado con ehrlichiosis la presencia de sangrado prolongado durante el proestro y el post-parto, infertilidad, abortos y muerte neonatal).<sup>(27)</sup>



**Figura 6.- hemorragias cutáneas puntiformes (petequias) en región costoabdominal.**



**Figura 7.- hemorragias cutáneas (eritema) en región inguinal.**

#### **d) Diagnostico diferencial**

La gran variedad de signos clínicos con los que puede cursar la ehrlichiosis, hace que el diagnostico diferencial deba incluir muy variadas patologías. No obstante, la que con más frecuencia se puede confundir con

ehrlichiosis, es la leishmaniosis canina, debido a la similitud con muchos de sus síntomas (hemorragias, apatía, linfadenopatía, pérdida de peso, uveítis, etc.), especialmente en animales con hiperproteinemia. También se debe descartar otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la babesiosis o la hepatozoonosis, por la similitud tanto de sus vectores como en ocasiones, de su sintomatología. También debe diferenciarse de leptospirosis. <sup>(1)</sup>

Otra patología con sintomatología y alteraciones en la analítica sanguínea similares es el lupus eritematoso sistémico. En ehrlichiosis, a pesar de la gran cantidad de autoanticuerpos producidos no se han encontrado anticuerpos antinucleares, característicos del lupus eritematoso sistémico. La presencia de linfocitosis granular o la afectación de la médula ósea podría confundirla con procesos neoplásicos como el mieloma, la leucemia linfoblástica aguda o la leucemia linfocítica crónica <sup>(16)</sup>

## 7.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### a) Microscopia de luz-frotis

La microscopia de luz-frotis información acerca del número y forma de las células sanguíneas; se realiza con tinción eosina - azul de metileno. *Ehrlichia spp.* Se replica dentro de una vacuola unida a la membrana (es decir, mórula) que a veces se puede observar por microscopia de luz con frotis sanguíneos, en el interior monocitos (*E. canis* y *E. chaffeensis*) o granulocitos (*E. ewingii*). Su resultado se puede confundir con cuerpos de Döhle, granulaciones tóxicas, bacterias fagocitadas, detritos, plaquetas superpuestas, y síndromes como Chediak-Higashi. <sup>(31)</sup>

La evaluación microscópica de cuerpos de inclusión en frotis sanguíneos resulta una técnica rápida, sencilla y económica, sin embargo, aproximadamente sólo en un 4% de los casos agudos es posible demostrar la mórula intracitoplasmática de *E. canis*, mientras que para las demás especies no se reporta la eficacia de la prueba. En el caso del aislamiento *in vitro* de

*Ehrlichia*, *E. canis* y *E. chaffeensis* han logrado cultivarse en la línea celular macrófago-monocítica canina DH82, derivada de un caso de histiocitosis maligna canina; sin embargo, *E. ewingii* no ha sido posible de aislar hasta la fecha. Desventajas importantes del aislamiento en cultivo celular, son la necesidad de experiencia técnica y períodos prolongados de hasta 34 días para la obtención de resultados, lo que convierte a esta técnica en un proceso costoso, laborioso e impráctico para el diagnóstico oportuno de la enfermedad.<sup>(26)</sup>

### **b) Examen hematológico**

La trombocitopenia es el hallazgo hematológico más común y consistente en la EMC aguda. Un aumento concurrente y significativo del volumen medio de plaquetas es también usualmente visto, reflejando una trombopoyesis activa. En la fase aguda de la enfermedad es común la leucopenia y la anemia moderada (usualmente normocítica, normocrómica, no regenerativa). La trombocitopenia moderada es un hallazgo común en la fase subclínica de la enfermedad. Puede haber un descenso en el número de los neutrófilos. Los parámetros eritrocíticos 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. La pancitopenia severa es la característica de la fase crónica grave y que ocurre como resultado de una médula ósea hipocelular suprimida.<sup>(32)</sup>

En sangre periférica se observan en agrupaciones bacterianas intracitoplasmáticas denominadas “formas densas” (0.2- 0.4 mm) y “formas ligeras” (0.8-1.5 mm), siendo éstas últimas asociadas a cepas de mayor patogenicidad.<sup>(11)</sup>

### **c) Bioquímica sanguínea**

Las principales anormalidades bioquímicas vistas en los perros infectados con EMC son la hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e

hipergamaglobulinemia. La electroforesis proteica sérica usualmente revela gamapatíapoliclonal, sin embargo, en raras ocasiones los perros infectados pueden presentar gamapatía monoclonal la cual puede ser mal diagnosticada como paraproteinemia. Los perros con pancitopenia presentan una significativa baja concentración de proteínas totales, globulinas totales y concentración de gammaglobulina en comparación con perros sin esta anormalidad. La baja concentración de gammaglobulinas asociada a la pancitopenia sugiere que el estado inmune del animal pancitopénico infectado con *E. canis* está más comprometido y, por lo tanto, las infecciones secundarias pueden ocurrir más frecuentemente en estos perros. Un aumento transitorio moderado en la actividad de la aminotransferasa y de la fosfatasa alcalina puede presentarse. <sup>(32)</sup>

#### **d) Análisis de orina**

En el uroanálisis las dos alteraciones más frecuentes son la proteinuria y la hematuria. La densidad específica de la orina se encuentra disminuida, así como en pacientes inmunocomprometidos es posible la aparición de infecciones secundarias con bacteriuria. Experimentalmente se observa una pérdida máxima de proteínas urinarias, en especial de albumina, 2 ½ a 3 ½ semanas después de la inoculación y se resuelve de semanas después de la infección. <sup>(11)</sup>

#### **e) Pruebas serológicas**

##### **1. Inmunofluorescencia**

Las pruebas de inmunofluorescencia pueden utilizarse para detectar anticuerpos o para detectar la presencia de un patógeno. En ambos casos la reacción finaliza mediante la adición de un anticuerpo conjugado a una sustancia fluorescente, habitualmente fluoresceína. Estas pruebas son muy sensibles pero su interpretación tiene un alto grado de subjetividad. Las pruebas de inmunofluorescencia presentan dos variantes, directa (detección de antígeno) e indirecta (detección de anticuerpo) (figura 7). <sup>(21)</sup>



**Figura 8. Variantes de la prueba de inmunofluorescencia**

La detección de anticuerpos de *E. canis* se puede realizar el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI), que es la prueba serológica más ampliamente utilizado para el diagnóstico de la infección con *E. canis*. La prueba de IFI ha sido considerada la prueba estándar de oro para la detección y titulación de anticuerpos de *E. canis*, se ha utilizado para evaluar otros ensayos de diagnóstico. Sin embargo, el IFA sólo puede realizarse en laboratorios especializados por personal calificado para evitar que los resultados puedan ser leídos de manera subjetiva. Además, la prueba IFI es lenta, engorrosa para analizar muestras múltiples simultáneamente, y no es una técnica fácil de realizar en un laboratorio estándar. Otras de las desventajas que presenta esta prueba es que detecta anticuerpos de infección y exposición, la persistencia de anticuerpos pos infección, su reacción cruzada (es una prueba cuantitativa) .Por

estas razones, los otros ensayos serológicos para el diagnóstico de infección por *E. canis* en perros necesitan ser desarrollados.<sup>(14)</sup>

## **2. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

En el análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) las reacciones cruzadas entre los anticuerpos a las especies de *Ehrlichia* es frecuente. Ocho de las principales proteínas inmunorreactivas de *E. canis* han sido identificadas por inmunotransferencia; y la mayoría también se han caracterizado molecularmente en *E. chaffeensis*, incluyendo p28/30, gp140, GP200, gp36, gp19, así como divergentes genéticamente heterólogas (p28, gp120, GP200, gp47 y VLPT, respectivamente). gp36 y gp19 de *E. canis* obtienen las respuestas tempranas de anticuerpos y especies específicas de anticuerpos reactivos, que también ha sido demostrado con GP200 (N terminal, P43) y gp140. Muchas de estas proteínas principales inmunorreactivas parecen ser antígenos útiles para un inmunodiagnóstico, incluyendo p28/p30, los gp140, GP200, y MAP2, comercialmente se ha desarrollado una prueba de ELISA para la diagnóstico de CME sobre la base de la reactividad de anticuerpos a dos péptidos p30 de *E. Canis*. Esta prueba (Snap 3DX) tiene una alta especificidad en comparación con los resultados de IFA cuando los sueros se utilizan se obtienen de perros infectados de forma natural y experimentalmente, pero su sensibilidad con sueros que contienen bajos títulos de anticuerpos (<320) sigue siendo cuestionable. Un ELISA recombinante MAP2 *E. canis* ha demostrado altos grados de sensibilidad y especificidad, pero ninguna de estas ELISA es capaz de distinguir las infecciones causadas por *E. canis* y *E. chaffeensis*.<sup>(2)</sup>

Las pruebas serológicas presentan varias desventajas: los anticuerpos IgM e IgG no son detectables hasta por lo menos 1-3 semanas después de la infección, y se producen reacciones cruzadas entre las especies de *Ehrlichia*. Ambos de estos factores a veces pueden hacer un diagnóstico diferencial difícil.

Alternativamente, el uso de aislamiento en cultivo celular (CCI) para la detección de *E. canis* en sangre de los perros infectados es sensible y específica. Sin embargo, el ICC requiere 1-4 semanas para obtener resultados, lo que limita su utilidad como una herramienta de diagnóstico rápido.<sup>(18)</sup>

Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas en el diagnóstico de ehrlichiosis debido a que son pruebas altamente sensibles; sin embargo, presentan la desventaja de que únicamente evidencian un contacto con el agente sin determinar la existencia de la enfermedad o incluso la presencia o ausencia actual del agente en el animal. Otra desventaja importante en el diagnóstico serológico, es el alto grado de reacción cruzada existente entre *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*; que dificulta la diferenciación entre especies y para el caso de *E. ewingii*, no existen pruebas específicas disponibles, por no haberse logrado aún ningún aislamiento del agente en cultivo celular.<sup>(23)</sup>

## **f) Pruebas moleculares**

### **1. Reacción en cadena de la polimerasa**

El avance en la investigación ha contribuido a mejorar las técnicas diagnósticas para esta enfermedad, detectándose secuencias específicas del gen ADN ribosómico 16S del microorganismo causal, mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa anidada y RT-PCR.<sup>(11)</sup>

El gen 16S rRNA de *E. canis* fue secuenciado parcialmente en 1996, revelando 1433 pb. La secuencia fue terminada en 2007 y ha sido descrita y depositados en GenBank bajo el número de CP000107. La secuencia completa del genoma revela que *E. canis* tiene un único cromosoma circular de 1,315,030pb que codifica para 925 proteínas, que puede estar asociada con las interacciones huésped-patógeno.<sup>(3)</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa (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 (pueden ser genéricos o especie- específico), cuyas secuencias son complementarias de las secuencias del ADN del organismo que se investiga. PCR es el método molecular más común para diagnosticar *Ehrlichia* spp, particularmente en perros con enfermedad aguda con signos clínicos que pueden preceder a una respuesta medible de anticuerpos.<sup>(1)</sup>

Diversos estudios han mostrado a la técnica de PCR como un método efectivo y extremadamente sensible para la detección de especies de *Ehrlichia*, incluyendo a *E. ewingii*. La técnica de PCR convencional basada en la amplificación de regiones del gen 16S ARNr de *Ehrlichia* ha demostrado efectividad en muestras de sangre de humanos y perros, con un límite de detección de 20 pg para ADN de *E. canis* extraído de células DH82 infectadas, y se han obtenido aún mejores resultados, utilizando una técnica de PCR tipo anidado, que ha incrementado la sensibilidad de la prueba hasta 0.2 pg de ADN. Además, la técnica de PCR tipo anidado ofrece la ventaja de poder determinar las especies *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* utilizando el mismo producto de la primera reacción. Esta técnica de PCR anidada, ha demostrado ser útil para el diagnóstico de ehrlichiosis en distintas partes del mundo como Israel, España, Estados Unidos y México, ya sea para diagnosticar los agentes en muestras de humanos, venados, perros, garrapatas y coyotes.<sup>(23)</sup>

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.<sup>(15)</sup>

Los cebadores utilizados para detectar *Ehrlichia* pueden ser genéricos o especie específicos. Los cebadores genéricos detectan muchos de los grupos de organismos dentro del mismo género, mientras que los cebadores específicos diseñados para amplificar porciones altamente variables del genoma pueden ser elegidos para identificar sólo una especie particular de organismo. El protocolo de PCR ampliamente empleado para detectar *E. canis* es 16S rRNA PCR anidada, pero la variación limitada de la secuencia de genes entre bacterias relacionadas resulta con una amplificación inespecífica. Aunque la patogénesis ehrlichiosis es poco conocida, algunos estudios muestran que las familias multigénicas que pertenecen al género *Ehrlichia* puede estar implicado en la evasión de la inmunitad de acogida sistema por la variación de expresión importante antígeno de superficie. Los 28 kDa proteínas inmunodominantes de membrana externa de *E. canis* codificada por una familia multigénica (gen p28) se ha informado recientemente de este gen también se presenta en América del Norte. Es probable que la proteína P28 de *E. canis* tiene una ubicación y función similares a la de la P28 de *E. chaffeensis*. Hay evidencias de que la proteína P28 *E. canis* puede ser un antígeno serodiagnóstico fiable.<sup>(9)</sup>

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una técnica fiable para el análisis de ADN, específica y secuencial de ARN. El uso de tintes no específicos en qPCR tiene varias ventajas, incluyendo la capacidad para detectar la contaminación de productos inespecíficos. Tinciones inespecíficas permiten el análisis de la temperatura de fusión ( $T_m$ ). La generación de productos de amplificación no específicos resultan a partir de productos dímeros de hibridación no apropiado para los cebadores designados. Estos subproductos no deseados se forman debido a la débil complementariedad entre los extremos 3' de un cebador. Los subproductos permiten la hibridación de los cebadores a las hebras, seguido por la iniciación y la elongación de dímeros de ADN polimerasa termoestable.<sup>(22)</sup>

Si bien en principio, el diagnóstico molecular parece el más específico y fiable en cuanto a la detección de organismos, tiene también sus limitaciones. Así la extremada sensibilidad de estas pruebas, puede conducir con facilidad a resultados falsos positivos por contaminación.<sup>(15)</sup>

Otro inconveniente para la realización de estas pruebas con fines diagnósticos es el económico, aunque es plenamente justificable con fines de investigación.<sup>(11)</sup>

### **g) Diagnostico histopatológico**

En caninos con EMC se han observado lesiones en diversos órganos y tejidos. Entre los hallazgos histopatológicos mas frecuentes se incluyen las infiltraciones de células linforeticulares y de células plasmáticas en diversos órganos y tejido incluyendo sistema nervioso, riñones, pulmón, hígado y tejido linfoide. La infiltración celular y la proliferación linfocitaria modifican la arquitectura microscópica de los linfonódulos y del bazo.<sup>(16)</sup>

Recientemente, se realizó un estudio utilizando 4 animales experimentalmente infectados con E. canis. Los hallazgos histopatológicos indicaron que todos los animales infectados presentaron cuadros hiperplásicos en los nódulos linfáticos comprometidos, tanto en la región folicular, paracortical y medular, siendo células mononucleares y plasmocitos los tipos celulares predominantes. Se observó histiocitosis, eritrofagocitosis y vasculitis mononuclear. Las lesiones esplénicas fueron hemorragias multifocales e hiperplasia linforeticular en región folicular, así como congestión de la pulpa blanca. En 2 animales se observaron cambios en el hígado, observando cuadros severos de esteatosis, infiltración perivascular y periportal de células mononucleares, así como congestión de los sinusoides hepáticos. En todos los animales infectados experimentalmente se observó glomerulonefritis crónica y vasculitis caracterizada por infiltración de las células mononucleares, así como cuadros de meningitis con infiltración de células mononucleares y presencia de

gruesos agregados perivasculares de este tipo celular afectando la corteza cerebral, cerebelo y medula. Finalmente trastornos similares de infiltración de células mononucleares y cuadros de vasculitis se observaron en los septos alveolares en los pulmones. <sup>(11)</sup>

La infección por *E. canis* ocasiona enfermedad ocular y meningitis. De este modo, no es frecuente que otras especies ehrlichiales que infectan al perro, ocasionen alteraciones histopatológicas a nivel ocular, pero se ha reportado la uveítis producida por *E. ewingii*. Además se sabe que solo existe un reporte de uveítis ocasionada por la infección con *A. platys*. <sup>(11)</sup>

#### **h) Paquetes comerciales**

Algunas de las pruebas serológicas comerciales están disponibles para detección de *E. canis* anticuerpos basado en toda *E. canis* organismos como la fuente de antígeno. Estos incluyen pruebas de ELISA, la prueba Immunocomb, otra prueba, ensayo de inmunocromatografía (Snap 3Dx), basado en la proteína específica P30 clonada y expresado como una proteína de fusión en el Sistema de *Escherichiacoli*, ha sido recientemente modificada y ahora usa *E. canis* sintéticos (péptidos P30, P30-1) derivada de *E. canis* inmunodominante epítomos. Varios grupos han informado de la expresión de diferentes *E. canis* proteínas recombinantes (proteína antigénica importante). <sup>(14)</sup>

### **8.- TRATAMIENTO**

Las tetraciclinas son los fármacos de elección para el tratamiento de las enfermedades causadas por *rickettsias*. Tetraciclina oral y oxitetraciclina inyectable ambos son tratamientos efectivos para EMC, y doxiciclina oral, ha presentado la incidencia más baja de tratamiento siguiente enfermedad recurrente. Aunque doxiciclina alivia clínica EMC, hay preguntas respecto a la eficacia de este antibiótico para la eliminación de *E. canis*. Algunos informes sugieren que la persistencia de la infección por el siguiente los regímenes de doxiciclina de forma natural y experimental los perros infectados durante la fase aguda de EMC. Otro informe sugiere que *E. canis* fue eliminada después de los

tratamientos con doxiciclina de los perros durante la fase aguda de EMC. Además, es de relevancia de la *E. canis* después de EMC aguda se pone en duda debido a un fallido intento de infectar a *R. sanguineus* en perros durante EMC subclínica. Sin embargo, la utilidad de tratamientos con antibióticos para reducir al mínimo la posibilidad de que *E. canis* se transmita a los hospedadores invertebrados deben ser confirmados.<sup>(12)</sup>

La doxiciclina actúa favoreciendo la fusión entre los fagosomas, donde se encuentran las erliquias, y los lisosomas. También posee actividad bacteriostática, se implanta en los ribosomas de la bacteria e inhibe, de este modo, la síntesis de proteína bacteriana. Se han empleado diversos protocolos de tratamiento con la doxiciclina, aunque actualmente se aconseja administrar la doxiciclina en dosis diaria de 10 mg/kg. En cuanto a la duración del tratamiento, si en un principio se recomendaron tratamientos de 7 a 14 días, la recomendación actual es la de mantener el tratamiento durante 28 días. Los protocolos de tratamiento más cortos pueden dar lugar a una mejoría inicial del paciente, pero los síntomas suelen volver a aparecer.<sup>(15)</sup>

El tratamiento para la ehrlichiosis canina consiste principalmente de antibióticos y el tratamiento de apoyo. El costo y los posibles efectos secundarios producidos por los antibióticos estimular la investigación que culminará con el desarrollo de nuevas técnicas y los agentes que pueden minimizar estos costos y no deseados efectos. De acuerdo con Sartori HE (Ozone the eternal purifier of earth and cleanser of all living beings. Michigan LifeScienceFundation) las seis indicaciones específicas para el uso tópico del ozono son infecciones de la piel por virus como: El herpes simplex y zoster, las infecciones de las infecciones bacterianas, como impétigo, el ectima contagioso B-hemolítico *Streptococcus* y *Staphylococcus aureus*, infecciones por hongos incluyendo la tiña por *Trichophyton spp*, candidiasis y la pitiriasis versicolor, infecciones por protozoos sobre todo la leishmaniasis, una parasitosis, incluyendo la sarna sarna *Sarcoptes*, La pediculosis y larva migrans cutánea

*Ancylostomabrasiliensis*, las condiciones multifactoriales la piel como acné, psoriasis, erupciones cutáneas, pénfigo y dermatitis herpetiforme, e inflamatorias enfermedades de la piel como la dermatitis, el eczema y la urticaria. El ozono puede ser utilizado en la clínica veterinaria para el tratamiento de situaciones siguientes: la restitución de la anestesia en 30 segundos (20 ml la concentración de ozono en 20 mg / ml a través de insuflación rectal), trauma (aceite ozonizado de uso tópico y posterior lavado con agua ozonizada), trastornos no parasitaria gastrointestinal (ingestión de 20 a 50 ml de agua ozonizada en primera día, 2 a 3 ml / día de aceite ozonizado) en la otitis media (aplicación aceite ozonizado seguido por pequeña autohemoterapia hecho con 2 a 3 ml de sangre ozonizada mezclado con 5 ml de ozono concentración 20 mg / ml durante 3 a 4 días). Se observa la reducción del dolor: como adyuvante terapia en la laminitis (20. 000 gramos de ozono en 1 000 ml de sangre antes de la anestesia y después de la cirugía, repita de 5 a 6 veces), en la parálisis post-parto en el ganado bovino (30 mg ozono/1.500 ml de sangre) en la metritis postparto (500 ml de agua ozonizada seguido por el sitio de aplicación de dos días 1 a 2 ml de aceite ozonizado). El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de autohemoterapia con ozono en el tratamiento de la ehrlichiosis canina. Se utilizaron 80 ml de sangre de la vena yugular, se recogió en una bolsa estéril de transfusión de sangre que contiene 13 ml de citrato sódico al 3,8% (380mg/ml.) El volumen de sangre (80 ml) fue calculado en base al peso de animal (suponiendo que el volumen total representa 8% de peso corporal), y correspondían a 5% del volumen total de sangre se ve que el animal tenía 20 kg de peso corporal. La mezcla de oxígeno-ozono (OOM) se añadió a la bolsa que contiene sangre en una proporción de 1:1. MOO fue producida por un generador con una capacidad de producción de 0,00023 g / min, accionado por ampolla de oxígeno con 99,5% de pureza a una presión de aproximadamente 250 kgf/cm<sup>2</sup> con un flujo de 3 l / min. Después de la homogeneización de ozonización y constante, la sangre era devuelto al animal a través de la vena yugular o radial. Este proceso se llevó a cabo dos o tres

veces por semana. La autohemoterapia ozonizada fue eficaz en la reversión de los hallazgos clínicos y de laboratorio de Ehrlichiosis en un perro. <sup>(9)</sup>

## **9.- EVOLUCIÓN POST TRATAMIENTO**

La mejoría clínica precede en el tiempo a la normalización de la analítica. En este sentido, a las 24-48 horas de iniciado el tratamiento suele apreciarse una mejoría clínica importante en perros en fase aguda o fase crónica leve de la enfermedad. Sin embargo, la eficacia clínica del tratamiento se puede retrasar incluso 6 semanas, en formas crónicas. Los parámetros laboratoriales que más rápidamente se normalizan son los recuentos de eritrocitos y de plaquetas, normalizándose habitualmente a los 14 días de tratamiento. Incluso en casos crónicos, si el cuadro clínico y los parámetros hematológicos no mejoran en una o dos semanas desde el inicio del tratamiento, se debería reevaluar el diagnóstico, ya que la falta de mejoría puede ser debida a una infección crónica grave o a la existencia de coinfección con otro microorganismo o de una concurrencia con una enfermedad no infecciosa. La mayoría de los casos que no responden al tratamiento, en ausencia de otra infección, presentan insuficiencia renal y/o aplasia medular severa. El proteinograma tarda en normalizarse entre 3 y 9 meses, siendo empleado rutinariamente para confirmar la presencia de una buena respuesta al tratamiento a largo plazo. <sup>(16)</sup>

El seguimiento de la evolución de la enfermedad en base a una monitorización serológica se ve dificultada por el hecho de que, si bien los títulos de anticuerpos suelen empezar a disminuir entre 3 y 9 meses tras el tratamiento de la enfermedad, muchas veces pueden mantenerse elevados durante largos periodos de tiempo, incluso varios años, sin ninguna otra alteración clínica ni laboratorial. Aún queda por determinar el significado real de esta persistencia en el título de anticuerpos. <sup>(16)</sup>

En teoría, un buen método de elección para evaluar la persistencia de una infección por *Ehrlichia* sería la realización de PCR de un aspirado esplénico; otros tejidos que pueden emplearse para el PCR serían médula ósea

o sangre, pero la sensibilidad de la técnica es inferior. La PCR debería negativizarse tras el tratamiento de la enfermedad; sin embargo no se han encontrado estudios que verifiquen esta afirmación. Se desconoce el tiempo de permanencia del ADN de *Ehrlichia canis*, tras un tratamiento eficaz, en el hospedador. Sin embargo, algunos autores aconsejan volver a tratar con igual o diferente protocolo aquellos animales tratados correctamente en los que la PCR sea positiva y no se observe una resolución clínica y laboratorial. <sup>(16)</sup>

## **10.- PROFILAXIS**

La transmisión obligada de la ehrlichiosis a través de garrapatas, exceptuando la transmisión por transfusión sanguínea, hace que la profilaxis de la infección esté dirigida al control de garrapatas, tanto en el animal, como en el medio en el que se encuentre. <sup>(1)</sup>

Para evitar la transmisión, es necesario impedir la alimentación de la garrapata, ya que es en ese periodo cuando se producirá la transmisión. Las medidas profilácticas también deben aplicarse a aquellos animales diagnosticados de ehrlichiosis debido al riesgo de reinfecciones que estos animales tienen, ya que normalmente el medio en el que residen continúa siendo el mismo y hay que romper la cadena epidemiológica. <sup>(16)</sup>

El principal objetivo del tratamiento profiláctico debe ir encaminado a evitar la alimentación de la garrapata, bien a través de un efecto repelente, un efecto letal instantáneo o un efecto que permita la separación de la garrapata del hospedador antes del tiempo necesario para la transmisión del agente infeccioso, es decir, antes de 24 horas. A este principal objetivo ha de sumarse la obtención de un producto cuyo efecto perdure sobre el animal y carezca de toxicidad. El único producto comercializado para perros que posee efecto anti-picadura y efecto activador de la separación de la garrapata del hospedador, unido a un efecto prolongado y un elevado margen de seguridad es el collar de amitraz. Se ha observado que los collares con deltametrina poseen también

actividad garrapaticida; sin embargo su eficacia es inferior a la de los collares con amitraz. Otro punto importante en la profilaxis de las infecciones transmitidas por garrapatas sería la actuación a nivel del medio ambiente y un buen medio para ello sería conseguir romper el ciclo biológico. Así el empleo de inhibidores de formas juveniles como el piriproxifeno en unión a un adulticida permitiría la inhibición de los huevos producidos por las garrapatas supervivientes. <sup>(1)</sup>

## 11.- INMUNIZACIÓN

Sobre la membrana externa de los organismos ehrlichiales existen diferentes proteínas que actúan como antígenos, estas moléculas ocasionan los diversos trastornos en los hospederos susceptibles a ellos. Las proteínas de membrana externa (OMP) de 30 kDa., son un grupo de antígenos inmunodominantes de *E. canis*, los cuales presentan una reacción cruzada muy fuerte con los antígenos de 28 kDa. (OMP-1s) de *E. chaffeensis*, por EITB de sueros de animales experimental y naturalmente infectados. <sup>(11)</sup>

Se sabe que *E. canis* y *E. chaffeensis* son muy similares por la homología del gen ARNr 16S. Las proteínas p30 y OMP-1s son codificadas por una familia polimórfica y la inmunización de ratones con OMP-1 recombinante protegió a los ratones de la infección ehrlichial. <sup>(11)</sup>

Recientes estudios revelaron que esta familia de proteínas p30 de *E. canis* estaba constituida por 22 genes polimórficos, los cuales son similares entre si, pero no idénticos. Todos los genes de la familia p30 se han expresan en células CH82 (línea celular de monocitos caninos) y analizados con RT-PCR. Actualmente ya se ha determinado la expresión de estos 22 genes polimórficos que conforman la familia de p30 en *E. canis*. Se infectaron experimentalmente garrapatas (adultos, hembras y ninfas), perros y monocitos DH82 (cultivo celular), buscado evaluar la expresión de estos genes ambientales, así como la expresión de estos en el cultivo celular a temperaturas

de 25°C. Los resultados indicaron que las garrapatas expresaron predominantemente el gen p30-10 y en perros se expresaron otros genes de la familia p30, pero no la p30-10. Además se determinó que la temperatura óptima para la expresión génica en cultivo celular (monocitos DH82) era de 25 °C. <sup>(11)</sup>

La variación antigénica es un problema que complica la fabricación de vacunas a nivel mundial, debido a que los microorganismos patógenos modifican su estructura y el sistema ya no reconoce al patógeno. El gen p30-10 es el único que se expresa en garrapatas experimentalmente infectadas. Esta es expresada en las glándulas salivales e intestino de las garrapatas adultas (machos y hembras) y ninfas. Los genes que se expresan en el perro son diferentes a los vistos en los artrópodos y se asocian con el cuadro severo en este hospedero. El gen p30-10 ha sido detectado en garrapatas naturalmente infectadas, desechando la posibilidad que la expresión de este gen en el laboratorio no se de naturalmente. Inclusive ha sido detectado en garrapatas en zonas de diversas zonas geográficas de los estados unidos, de tal forma que actualmente se están realizando trabajos en el cual esta proteína es propuesta como antígeno para la elaboración de vacunas utilizando la tecnología recombinante. <sup>(11)</sup>

*Borrelia burgdorferi*, realiza un sistema de evasión del sistema inmune al alterar sus antígenos tanto en garrapatas como en mamíferos. La proteína OspA se expresa en cantidades altas en intestino de garrapatas infectadas. Recientemente se ha fabricado una vacuna recombinante (RecombitekLyme), la cual previene la transmisión de esta bacteria hacia los mamíferos por neutralización de esta proteína en el intestino de la garrapata después de ingerir la sangre del animal vacunado, es decir con anticuerpos específicos contra esta proteína. Se especula que en el futuro, por analogía al sistema aplicado en *B. burgdorferi*, la p30-10 pueda ser utilizada como candidata para la elaboración de vacunas contra la ehrlichiosis transmitida por *E. canis*. <sup>(11)</sup>

## 12.- REFERENCIAS

- 1.- Angulo Campos Jaime Manuel y Rodríguez Vélchez (2005). Diagnostico situacional de cuatro hemoparásitos en canes menores de un año, en cinco barrio del distrito VI-2 de Managua.
- 2.- Beall Melissa J., Alleman Rick, Breitschwerdt Ed B., Cohn Leah A., Couto C Guillermo, Dryden Michael W, Guptill Lynn C., Iazbik Cristina, Kania Stephen A., Lathan Patty, Little Susan E., Roy Alma, Saylor Katherine A., Stillman Brett A., Welles Elizabeth G., Wolfson Wendy y Yabsley Michael J. (2012) . Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America.
- 3.- Cardenas Ana Maria, Kuyler Doyle C., Zhang Xiaofeng, Nethery Kimberly, Corstvet Richard E., Walker David H. y McBride Jere W. (2007) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Conserved Immunoreactive Glycoproteins gp36 and gp19 Has Enhanced Sensitivity and Provides Species-Specific Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection. CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, p. 123–128 Vol. 14, No. 2 1556-6811/07/\$08.00\_0 doi:10.1128/CVI.00361-06, American Society for Microbiology.
- 4.- Carvalho F.S., Wenceslau A.A., Carlos R.S.A. y Albuquerque G.R. (2008). Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil.
- 5.- C. C. Lord Published: July 2001. Revised: October 2008. Reviewed: December 2011. University of Florida Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Arachnida: Acari: Ixodidae).
- 6.- Dantas-Torres Filipe. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.
- 7.- Dumler J. Stephen, Madigan John E., Pusterla Nicola y Bakken Johan S. (2007). Ehrlichiosis in Humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment.

8.- Fernández soto Pedro. (2008). Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección moleculaza de los patógenos que albergan.

9.- García César Augusto, Prado Berbert Ricardo, Moya Rodríguez Gustavo, Gatti de Oliveira Nascimento Fernanda, Ferreira Cipriano Luanda, AcciardiViolatti Isabel Cristina. 2010.El uso de la autohemoterapia con ozono como tratamiento de la ehrlichiosis canina: informe de un caso Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 41, 2010, pp. 1-7

10.- Higa Nakaghi Andrea Cristina, Zacarías Machado Rosangela, Aparecido Ferro Jesús, BahiaLabruna Marcelo, Lazaros Chryssafidis Andreas, Rogério André Marcos, DivanBaldani Cristiane. (2010) Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis, Rev. Bras.Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 75-79, abr.-jun. 2010).

11.- Hoyos Sifuentes Luis Antonio. (2005). Evaluación del examen hematológico y la técnica de ELISA en el diagnostico clínico laboratorial de ehrlichiosis canina.

12.- Hoyos S. Luis, Li E. Olga, Alvarado S. Arnaldo, Suárez A. Francisco y Díaz C. Diego. (2007). Evaluación del examen hematológico en el diagnostico de ehrlichiosis canina.

13.- León Avelina, Demedio Jorge, Márquez Mario, Castillo Elio, Perera Anayram, ZuaznabaOliever, Caníbal Javier, González Bárbara, Reynaldo Lázaro, Vega Natan, Blanco Diuris, Ronda Marisel, Peña Amelia, Seija Víctor. (2008). Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de La Habana.

14.- León GoñiAvelina Caridad y Gómez Rosales Dennys. (2007). Ehrlichiosis canina.

15.- López Lissett, Venteo Ángel, Aguirre Enara, García Marga, José Rodríguez Ma., Amusategui Inmaculada, Tesouro Miguel A., Vela Carmen,

Sainz Ángel, Rueda Paloma. (2007). Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against *Ehrlichia canis*.

16. - Lorente Méndez Carmen. (2005). Evaluación hematológica e inmunofenotípica de la "ehrlichiosis canina": evolución tras la administración de "dipropionato de imidocarb".

17.- Massaro W. Ueti, James O. Reagan, Jr., Donald P. Knowles, Jr., Glen A. Scoles, Varda Shkap, and Guy H. Palmer.(2007). Identification of Midgut and Salivary Glands as Specific and Distinct Barriers to Efficient Tick-Borne Transmission of *Anaplasma marginale*.

18.- Mayors Laboratorio. Fichas técnicas enfermedades (Ehrlichiosis canina) <http://www.mayorslab.com.ar/enfermedades/enfermedades.html> (Consulta: 29/01/2012).

19.- McBride Jere W., Corstvet Richard E., Gaunt Stephen D., Chinsangaram Jarasvech, Akita Geoffrey Y. y Osburn Bennie I. (2007) PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs.

20 - McQuiston Jennifer H., McCall Candace L. y Nicholson William L. (2008). Ehrlichiosis and related infections. Meneses Guevara Ana (2008). Diagnostico y aspectos clínico patológicos de la ehrlichiosis monocítica canina.

21.- Meneses Guevara Ana (2008). Diagnostico y aspectos clínico patológicos de la ehrlichiosis monocítica canina.

22.- Morales Soto Manuel y Nava Juárez Raúl A. Construcción de un control integral de *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille) (Acárida: Ixodidae) en Morelos, México. Investigación Agropecuaria. 2006. Volumen 3. p. -122.

23. - Nethery Kimberly A., Doyle C. Kuyler, Zhang Xiaofeng y McBride Jere W. (2007). *Ehrlichia canis* gp200 Contains Dominant Species-Specific Antibody Epitopes in Terminal Acidic Domains.

24. - Peleg Ofer, Baneth Gad, Eyal Osnat, Inbar Jacob, y Harrus Shimon. (2009) Use of Chimeric DNA-RNA Primers in Quantitative PCR for Detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*.
- 25.- Quiroz Romero Héctor. (2005) Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Limusa.
26. - Rivas Lara Vanessa, Morales Arancibia Daniel, Sáenz Milton, Bonilla José Luis. (2010) Hallazgo de Ehrlichiosis canina causada por *E. canis* en una Comunidad del Municipio de León, Nicaragua. REDVET Rev. Electrón. Vet. Vol. 11, Nº 03, Marzo/2010.
27. – Schaefer John J., Needham Glen R., Bremer William G., Rikihisa Yasuko, Ewing S. A., y Stich R. W. (2007). Tick Acquisition of *Ehrlichia canis* from Dogs Treated with Doxycycline Hyclate.
28. – Strik N. I., Alleman A. R., Barbet A. F., Sorenson H. L., Wamsley H. L., Gaschen F. P., Luckschander N., Wong S., Chu F., Foley J. E., Bjoersdorff A., Stuen S. y Knowles D. P. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* Major Surface Protein 5 and the Extent of Its Cross-Reactivity with *A. marginale*.
- 29.- Tinoco-Gracia L., Quiroz-Romero H., Quintero-Martínez M.T, Rentería-Evangelista T.B., González-Medina Y., Barreras-Serrano A., Hori-Oshima S., Moro M.H. y Vinasco J. (2009). Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border.
30. – Venzal J. M. *et al.* (2007). Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus*.
- 31.- Vinasco Javier, Li Olga, Alvarado Arnaldo, Díaz Diego, Hoyos Luis, Tabachi Luis, Sirigireddy Kamesh, Ferguson Carolyn, y Moro Manuel H. (2007). Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America.
32. - Waner T. y Harrus S. (2007) Ehrlichiosis monocítica canina.