

1-1-2017

## Descripción del estado de infección en enfermedades rickettsiales en caninos de los municipios de El Espinal y La Mesa mediante el uso de pruebas diagnósticas (hematológica, serológica y molecular) y su relación con el cuadro clínico

Isabel María Ricardo Niebles  
*Universidad de La Salle, Bogotá*

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/maest\\_ciencias\\_veterinarias](https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias)

---

### Citación recomendada

Ricardo Niebles, I. M. (2017). Descripción del estado de infección en enfermedades rickettsiales en caninos de los municipios de El Espinal y La Mesa mediante el uso de pruebas diagnósticas (hematológica, serológica y molecular) y su relación con el cuadro clínico. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/maest\\_ciencias\\_veterinarias/75](https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/75)

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Maestría En Ciencias Veterinarias Con Énfasis En Medicina Interna Y Cirugía De Pequeños  
Animales



DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE INFECCIÓN EN ENFERMEDADES RICKETTSIALES  
EN CANINOS DE LOS MUNICIPIOS DE EL ESPINAL Y LA MESA MEDIANTE EL USO  
DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS (HEMATOLÓGICA, SEROLÓGICA Y MOLECULAR) Y  
SU RELACIÓN CON EL CUADRO CLÍNICO.

Tesis para optar a título de maestría

Isabel María Ricardo Niebles

Bogotá, junio 2017

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Maestría En Ciencias Veterinarias Con Énfasis En Medicina Interna Y Cirugía De Pequeños  
Animales



DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE INFECCIÓN EN ENFERMEDADES RICKETTSIALES  
EN CANINOS DE LOS MUNICIPIOS DE EL ESPINAL Y LA MESA MEDIANTE EL USO  
DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS (HEMATOLÓGICA, SEROLÓGICA Y MOLECULAR) Y  
SU RELACIÓN CON EL CUADRO CLÍNICO.

Tesis para optar a título de maestría

Isabel María Ricardo Niebles

Código: 76132210

Director

Ricardo Javier Piñeros Duque M.V. Esp., MSc.

Bogotá, junio 2017

## APROBACIÓN

**DIRECTOR**

---

Ricardo Javier Piñeros Duque

**JURADO**

---

César Díaz

**JURADO**

---

César Cabrejo

**JURADO**

---

Rafael Villalobos

## **DIRECTIVOS**

**RECTOR**

Hno. Alberto Prada Sanmiguel

**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dra. Carmen Amalia Camacho

**VICERRECTOR DE PROMOCIÓN Y  
DESARROLLO HUMANO**

Hno. Diego Andrés Mora Arenas

**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

Dr. Eduardo Ángel Reyes.

**VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y  
TRANSFERENCIA**

Dr. Luis Fernando Ramírez

**DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

Hno. Ariosto Ardila Silva

**DIRECTOR DE PROGRAMA DE  
POSGRADOS**

Dr. Luis Carlos Villamil

## COMPROMISO

Los trabajos de grado no deben contener ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias en primera instancia a mis padres, Rafael Augusto Ricardo Martínez y Enith Cecilia Niebles Lara, por brindarme siempre su incomparable amor, apoyo incondicional; por ser los promotores de mis sueños y realizaciones, por su compañía y gran disposición, estando siempre dispuestos a brindar apoyo, consejo y las palabras precisas en el momento preciso durante todos los espacios de mi vida.

Gracias a mi esposo Iván Camilo Oramas, por ser mi compañero, mi amigo la persona que ha impulsado mi vida brindándome su apoyo en todo momento, por estar a mi lado para construir una vida en común, por darme la felicidad de ser madre, esposa y una mujer emprendedora en diferentes facetas de la existencia.

A mi hijo Santiago Andrés Oramas Ricardo, por ser el motor de mi vida, la razón de mi existencia, por convertirse en el ser más valioso para toda la familia, porque con sus sonrisas, susurros, caricias y su esencia, me exige ser mejor mujer; ser una madre.

A la universidad por brindarme la formación integral, especialmente al Dr. Ricardo Piñeros, por su confianza, orientación, y por la oportunidad de realizar esta investigación, en pro del bienestar de nuestro objeto de estudio.

A la Dra. Paola Barato y a la empresa CORPAVET, por su apoyo y colaboración en la realización de las pruebas de PCR.

Gracias a la vida por todas las oportunidades dadas, por ofrecerme la presencia, el apoyo de tantas personas y seres que he encontrado durante mi camino, a todos: Gracias por existir.

## RESUMEN

**Descripción del estado de infección en enfermedades rickettsiales en caninos de los municipios de El Espinal y La Mesa mediante el uso de pruebas diagnósticas (hematológica, serológica y molecular) y su relación con el cuadro clínico.**

**Description of infection in rickettsial diseases in El Espinal and La Mesa municipalities' canines by using diagnostic tests (hematological, serological and molecular) and its relationship with the clinical sings.**

En la actualidad, existen múltiples variables que favorecen la transmisión de enfermedades como las infecciones rickettsiales, entre ellas se encuentran el incremento de tenencia de mascotas, cambio en los hábitos de cuidados de las mismas, convivencia con estas, interacción de las mascotas con otros animales en centros de guardería y la facilidad de los propietarios para llevarlas de un lugar a otro. El propósito de esta investigación es describir la presentación de las enfermedades rickettsiales (*Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp. y *Rickettsia* spp) en 50 caninos de los municipios de La Mesa y El Espinal, usando diferentes pruebas diagnósticas, ya que no existe un método único para este fin.

Se tomaron muestras de sangre de caninos, teniendo en cuenta como criterios de inclusión, la presentación de signos y anamnesis compatibles con estas infecciones. También se realizó cuadro hemático y prueba de SNAP, para evidenciar alteraciones hematológicas o la exposición de los organismos de interés. Sobre estas muestras se realizó extendido sanguíneo y pruebas con un kit comercial de PCR de Rickettsias, que detecta material genómico de los antígenos de *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Rickettsia*. Los resultados de estas pruebas (cuadro hemático, extendido sanguíneo, SNAP y PCR) fueron correlacionados entre sí, sumado a las características clínicas halladas en



consulta. Adicionalmente, del 50% del total de la muestra, se extrajeron 4 a 5 garrapatas de cada individuo, a las cuales se realizaron pruebas de PCR detectora de genoma de antígenos, cuyos resultados se correlacionaron con los resultados del canino del que se extrajeron.

En la población estudiada, los signos clínicos más comunes corresponden a temperaturas mayores a 38,5°C, anorexia, baja condición corporal y decaimiento. En cuanto a la prueba de SNAP, 35 caninos (70%) tuvieron resultados positivos a *Ehrlichia* y de estos, 9 (25,7%) fueron positivos a *Anaplasma* en simultáneo. Respecto a los resultados de PCR tanto en los caninos como en las garrapatas recolectadas, fueron negativos en su totalidad. En la diferenciación de *Ehrlichia* y *Anaplasma* bajo microscopía óptica de luz blanca en extensión sanguínea, no se encontraron microorganismos. Los caninos fueron positivos a la prueba rápida serológica detectora de anticuerpos (SNAP), pero negativos a extendido y a PCR, lo cual deja ver que no están en una fase aguda de la enfermedad.

Palabras clave: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, Garrapatas, Diagnóstico, PCR, SNAP, frotis sanguíneo.

## ABSTRACT

At present, due to different variables such as increased pet ownership, changes in their care habits, coexistence with them, the interaction of pets with multiple animals in day care centers and the ease with which Owners to carry them from one place to another, favors the transmission of many diseases among them, rickettsial infections. The purpose of this research was to describe the presentation of rickettsial diseases (*Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp. And *Rickettsia* spp) in 50 canines of the municipalities of La Mesa and El Espinal using different diagnostic tests, since there is no single method for this end.

For this study blood samples of canines were taken considering in the inclusion criteria the presentation of signs and anamnesis compatible with these infections. In addition to the above, it was considered the accomplishment of a hematological chart and SNAP test to show

hematological alterations or the exposure of the organisms to interest. These samples were designed to perform blood smears and tests with a commercial Rickettsia PCR kit that detects genomic material from *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Rickettsia* antigens. The results of these tests (blood count, blood draw, SNAP and PCR) were correlated with each other and with the clinical characteristics found in the study. In addition, 4 to 5 ticks were extracted from 50% of the total sample in the two groups, which were also tested for antigen genome PCR and the relationship with the canine results was obtained Extracted.

Regarding the clinical signs presented, it was found that the temperature higher than 38.5 ° C, anorexia, low body condition and decay were the most common within the population studied. As for the SNAP test, 35 canines (70%) had positive results for Ehrlichia and 9 canines (25.7%) were positive for *Anaplasma* at the same time. Regarding the PCR results in the canines and in the collected ticks, they were totally negative, in the differentiation of *Ehrlichia* and *Anaplasma* under light microscopy of white light in blood extension no microorganisms were found. The canines were positive for the SNAP test but negative for extended and PCR, which shows that they are not in an acute phase of the disease.

**Keywords:** Ehrlichia, Anaplasma, Rickettsia, Ticks, Diagnosis, PCR, SNAP, blood smear.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE GRÁFICAS.....	XIV
LISTA DE TABLAS.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	19
3.1. Enfermedades rickettsiales .....	19
3.1.1. Ehrlichiosis canina .....	21
3.1.1.1. Epidemiología.....	23
3.1.1.2. Patogenia y signos clínicos.....	26
3.1.1.3. Diagnóstico.....	32
3.1.1.4. Tratamiento.....	33
3.1.2. Anaplasma.....	35
3.1.2.1. Epidemiología.....	35
3.1.2.2. Patogenia y signos clínicos.....	37
3.1.2.3. Diagnóstico.....	38
3.1.2.4. Tratamiento.....	40
3.1.3. Fiebre exantemática de las montañas rocosas.....	41
3.1.3.1. Epidemiología.....	41
3.1.3.2. Patogenia y signos clínicos.....	42
3.1.3.3. Diagnóstico.....	42
3.2. Garrapatas.....	43
3.3. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) Y Serología (técnica de ELISA e Inmunofluorescencia indirecta IFA) .....	45
4. METODOLOGÍA .....	50
4.1. Localización.....	50
4.2. Población y muestra.....	50

4.2.1.	Criterios de selección .....	51
4.2.1.	Toma de muestras.....	51
4.3.	Análisis de laboratorio.....	53
4.3.1.	Hematología .....	53
4.3.2.	Hemogramas.....	53
4.3.3.	Prueba SNAP.....	54
4.3.4.	PCR .....	54
4.4.	Diseño estadístico.....	55
5.	RESULTADOS.....	56
5.1.	Observación clínica y Anamnesis. ....	56
5.1.1.	Valoración de temperatura .....	57
5.1.2.	Valoración de la condición corporal.....	58
5.1.3.	Anorexia y decaimiento.....	58
5.1.4.	Linfadenomegalia y otros signos.....	58
5.2.	Resultados del hemograma.....	59
5.2.1.	Análisis descriptivos para las variables de hemograma vs SNAP.....	59
5.2.2.	Diferencia de cada variable del hemograma de acuerdo al resultado de la prueba SNAP.....	60
5.2.3.	Comparación de los resultados en el hemograma por zona geográfica.....	62
5.2.4.	Bioquímica clínica.....	64
5.3.	Resultados de la evaluación del extendido sanguíneo.....	66
5.4.	Resultados de prueba SNAP.....	66
5.5.	Resultados de la detección de antígeno por PCR .....	67
5.6.	Resultados de pruebas y su asociación (SNAP, PCR Y FROTIS).....	67
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	69
8.	LISTA DE REFERENCIAS .....	80
9.	ANEXOS.....	87

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ORGANIGRAMA DONDE SE PUEDE OBSERVAR LA CLASIFICACIÓN DEL ORDEN RICKETTSIALES, LA CUAL SE COMPONE POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS INTRACELULARES OBLIGADAS. FIGURA REALIZADA CON BASE EN (GUILLEMI, TOMASSONE, & FARBER, 2015).....	20
FIGURA 2. ÁRBOL FILOGENÉTICO INFERIDO POR LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN <i>GROESL</i> DE LA FAMILIA ANAPLASMATACEAE (CICUTTIN, VIDAL, DE SALVO, BELTRÁN, & GURY, 2014). .....	21
FIGURA 3. POSICIÓN FILOGENÉTICA DE <i>EHERLICHIA CANIS</i> BASADOS EN SECUENCIAS EN 16S ARNr (VARGAS , Y OTROS., 2012). ENCONTRADA EN CANINOS DE COLOMBIA. ....	23
FIGURA 4. <i>RHIPICEPHALUS SANGUINEUS</i> , LA GARRAPATA MARRÓN DEL PERRO, EDITADO DE (LITTLE, 2010) .....	24
FIGURA 5. <i>DERMACENTOR VARIABILIS</i> , GARRAPATA AMERICANA DEL PERRO (BLAGBURN & DRYDEN, 2009). .....	25
FIGURA 6. ETAPAS DE <i>A. AMERICANUM</i> , VECTOR PRINCIPAL DE <i>E. CHAFFEENSIS</i> SE ALIMENTA DE CIERVOS COMO HUÉSPED PREFERIDO. LA INFECCIÓN DE <i>E. CHAFFEENSIS</i> SE ADQUIERE DURANTE LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS O NINFAS DE <i>A. AMERICANUM</i> Y POSTERIORMENTE ES TRANSMITIDA DURANTE LA ALIMENTACIÓN DE NINFAS O ADULTOS (MODIFICADO DE: NICHOLSON , Y OTROS., 2010). .....	27
FIGURA 7. MÓRULA DE <i>E. EWINGII</i> EN EL CITOPLASMA DE UN NEUTRÓFILO EN LA SANGRE DE UN PERRO INFECTADO. MODIFICADO DE (HARVEY, 2012A). .....	29
FIGURA 8. MÓRULA DE <i>E. CANIS</i> EN EL CITOPLASMA DE UN MONOCITO CANINO. MODIFICADO DE (HARVEY, 2012A). .....	31
FIGURA 9. PETEQUIAS NUMEROSAS EN PARTE VENTRAL DEL ABDOMEN DEBIDAS A UNA TROMBOCITOPENIA. TOMADO DE <a href="http://WWW.ORTOCANIS.COM">WWW.ORTOCANIS.COM</a> .....	31
FIGURA 10. PERRO CON SEVERA EPISTAXIS CAUSADA POR INFECCIÓN DE <i>E. CANIS</i> . (LITTLE, 2010) .....	34
FIGURA 11. CICLO DE TRANSMISIÓN DE <i>A. PHAGOCYTOPHILUM</i> . EL PATÓGENO SE ADQUIERE DE ROEDORES SIGMODONTINOS U OTROS RESERVORIOS DURANTE LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS O NINFAS DE GARRAPATAS <i>IXODES SPP</i> Y SE TRANSMITEN EN LAS TOMAS POSTERIORES DE NINFA O ADULTOS. MODIFICADO DE (NICHOLSON , Y OTROS., 2010). .....	36
FIGURA 12. <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> EN UN PERRO DE MONTAÑA BERNÉS DE 5 AÑOS DE EDAD. RECUPERADO DE (VETPRACTICE, 2010) .....	38
FIGURA 13. CORRELACIÓN ENTRE LA TROMBOCITOPENIA Y LA HIPOALBUMINEMIA, HIPO-A1-GLOBULINAEMIA Y HIPERGAMMAGLOBULINEMIA. DONDE PLT SON LAS PLAQUETAS; ALB,	

ES LA ALBÚMINA; ALFA 1, ALFA-1-GLOBULINAS; GAMMA, GAMMA-GLOBULINAS Y P, EL VALOR DE PROBABILIDAD. TOMADO DE (RAVNIK, Y OTROS, 2014).....	39
FIGURA 14. ESTRATEGIAS DE A. PHAGOCYTOPHILUM COMUNES PARA ESTABLECER LA INFECCIÓN EN HUÉSPEDES VERTEBRADOS Y EN GARRAPATAS. TOMADO DE (LITTLE, 2010).....	40
FIGURA 15. TAMAÑO RELATIVO DE GARRAPATAS SEGÚN SU ESTADO. MODIFICADO DE ((CDC) CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015) .....	44
FIGURA 16. CICLO DE VIDA DE LAS GARRAPATAS. TOMADO DE (FRONTLINE, S.F.).....	45
FIGURA 17. EN ESTA PRIMERA ETAPA LA DOBLE HÉLICE DE ADN SE SEPARA EN DOS HEBRAS. ESTO SE HACE REALIZANDO UNA INCUBACIÓN DE LA MUESTRA A ALTAS TEMPERATURAS (93°C A 97°C). TOMADO DE <a href="https://www.frro.utn.edu.ar">HTTPS://WWW.FRRO.UTN.EDU.AR</a> .....	46
FIGURA 18. EN EL SEGUNDO PASO QUE ES LA HIBRIDACIÓN, LOS CEBADORES SE UNEN A LAS ZONAS 3´ COMPLEMENTARIAS QUE FLANQUEAN EL FRAGMENTO QUE QUEREMOS AMPLIFICAR. ESTO SE REALIZA GRACIAS A LA BAJADA DE TEMPERATURA (50°C A 65°C). TOMADO DE <a href="https://www.frro.utn.edu.ar">HTTPS://WWW.FRRO.UTN.EDU.AR</a> .....	47
FIGURA 19. TERCERA ETAPA, ELONGACION. SE PRODUCE LA SÍNTESIS DE UNA CADENA SENCILLA EN LA DIRECCIÓN DE 5´A 3´MEDIANTE LA ENZIMA DE ADN POLIMERASA. LA CUAL INCORPORA LOS DESOXINUCLEÓTIDOS FOSFATO PRESENTES EN EL MEDIO SIGUIENDO LA CADENA MOLDE. TOMADO DE <a href="https://www.frro.utn.edu.ar">HTTPS://WWW.FRRO.UTN.EDU.AR</a> . .....	47
FIGURA 20. REACCIÓN DE PCR EN LA QUE LOS FRAGMENTOS SE AMPLIFICAN DE FORMA EXPONENCIAL. TOMADO DE (ESPINOSA, 2007; SELLON, 2003). .....	48
FIGURA 21. MOMENTO IDÓNEO PARA UTILIZACIÓN DE SEROLOGÍA EN LA DETECCIÓN DE INFECCIONES RICKETTSIALES. TOMADO DE (NICHOLSON, ALLEN, MCQUISTON, BREITSCHWERDT, & POCO, 2010).....	49
FIGURA 22. RECOLECCIÓN DE GARRAPATAS.....	52
FIGURA 24. TAMAÑO DE AMPLIACIÓN EN CADA MICROORGANISMO. TOMADO DE KIT COMERCIAL ACCUPOWER® RICKETTSIALES 3-PLEX PCR.....	54
FIGURA 25. CANINO NO. 35 DEL ESTUDIO CON SIGNOS DE SNC Y POLIARTRITIS. ....	59

## LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. DONDE SE PUEDE OBSERVAR LA PRESENTACIÓN DE LOS SIGNOS SEGÚN CADA ZONA GEOGRÁFICA. DONDE 1) TEMPERATURA $>38,5^{\circ}\text{C}$ , 2) ANOREXIA, 3) LINFADENOMEGALIA, 4) DESCARGA OCUONASAL, 5) SIGNOS DE SNC, 6) BAJA CONDICIÓN CORPORAL, 7) DECAIMIENTO. ....	56
GRÁFICA 2. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA EN $^{\circ}\text{C}$ DE LOS GRUPOS 1 Y 2. DONDE SE OBSERVA QUE EL GRUPO 1 PRESENTARON MAYOR VARIACIÓN DE TEMPERATURA, ASÍ COMO TAMBIÉN EL VALOR DE LA MEDIANA ERA MAYOR.....	57
GRÁFICA 3. MEDICIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LOS GRUPOS 1 Y 2. DONDE SE OBSERVA QUE EL GRUPO 2 MOSTRÓ UNA MENOR VARIACIÓN DE LA DE LAS PLAQUETAS A DIFERENCIA DEL GRUPO 1. ....	62
GRÁFICA 4. SE APRECIA LA MEDICIÓN DE LOS MONOCITOS DE UN GRUPO CON RESPECTO AL OTRO. DONDE EL GRUPO 1 MUESTRA UNA MEDIANA MAYOR A LA DEL GRUPO 2, Y ADICIONALMENTE MUESTRA MAYOR DISPERSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	63
GRÁFICA 5. MEDICIÓN DE RECUENTO LEUCOCITARIO, DONDE SE EVIDENCIA QUE EL PROMEDIO DE LOS DANTOS ES MAYOR EN EL GRUPO 1 Y A SU VEZ ESTE GRUPO TIENE MAYOR VARIANZA QUE EN EL GRUPO.....	64
GRÁFICA 6. SE PUEDE OBSERVAR QUE LOS RESULTADOS MÁS ALTOS EN LOS DOS GRUPOS EXCEDÍAN EL LÍMITE SUPERIOR DEL RANGO NORMAL DE LAS PROTEÍNAS EN CANINOS ADULTOS...	65
GRÁFICA 7. MEDICIÓN DE LAS GLOBULINAS EN G/L DE LOS GRUPOS 1 (LA MESA) Y 2 (EL ESPINAL). DONDE SE OBSERVA QUE EL GRUPO 2 MOSTRÓ UNA MAYOR VARIACIÓN DE LA GLOBULINA. ....	65
GRÁFICA 8. SE PUEDE OBSERVAR EL COMPORTAMIENTO DE LOS RESULTADOS DE ALBÚMINA.....	66

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. VALORES DE P CON UN VALOR DE CONFIANZA DEL 95%, EN EL ANOVA REALIZADO A LAS VARIABLES DEL HEMOGRAMA, ANALIZANDO LOS RESULTADOS POR GRUPOS, UNO DONDE EL RESULTADO DE SNAP FUE POSITIVO A EHRlichia spp O A EHRlichia spp Y ANAPLASMA spp Y OTRO DONDE FUE NEGATIVO. ....	61
TABLA 2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SNAP SEGÚN CADA AGENTE INFECCIOSO EVALUADO POR ESTA PRUEBA. ....	67
TABLA 3. SE PUEDE OBSERVAR LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN LOS CANINOS ESTUDIADOS. ....	68
TABLA 4. SIGNOS ENCONTRADOS EN CADA CANINO INCLUIDO EN EL ESTUDIO. SE ORGANIZÓ EN DOS TABLAS DEBIDO AL TAMAÑO QUE ABARCA. TENIENDO EN CUENTA QUE LOS ANIMALES NUMERADOS DEL 1 AL 23 SON DEL GRUPO 1 (LA MESA) Y DEL 24 AL 50 DEL GRUPO 2 (EL ESPINAL).....	95



## 1. INTRODUCCIÓN

Los caninos y los humanos están expuestos y susceptibles a enfermedades transmitidas por garrapatas como las infecciones causadas por bacterias Rickettsiales incluyendo *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* (Nicholson, Allen, McQuiston, Breitschwerdt, & Poco, 2010). De allí la importancia de un buen diagnóstico y reconocimiento de los estados de estas enfermedades, ya que se consideran potencialmente zoonóticas, además de la posibilidad que tienen de generar coinfección, y a su vez el compromiso de salud en los animales de compañía (Nicholson , y otros., 2010; Carrillo , y otros., 2012).

Actualmente, debido al incremento de tenencia de mascotas, el cambio en los hábitos de convivencia, la interacción de los animales de compañía con múltiples mascotas en centros de guardería y la facilidad de movilidad de un lugar a otro, favorecen la transmisión de muchas enfermedades, como las infecciones rickettsiales. Se puede decir que, a la fecha, hay más facilidad para realizar diagnósticos de infecciones rickettsiales; sin embargo, muchos de estos diagnósticos se efectúan con base en un cuadro clínico y resultados de hemograma compatibles con la patología, sin determinar si el agente causal es *Ehrlichia*, *Anaplasma* o *Rickettsia*. Adicionalmente, no existe un método único para el diagnóstico de estas enfermedades, el cual se realiza en algunos países con diversos grados de certeza a través de una combinación de indicadores clínicos y hematológicos, evidencia serológica y confirmación molecular (Cohn, 2003).

En Colombia de forma rutinaria se utilizan las pruebas rápidas SNAP detectoras de anticuerpos, llevando a los clínicos a malas interpretaciones y a tratamientos de los animales sin estar presente la enfermedad; estas pruebas de detección de anticuerpos permiten establecer la exposición, mas no un estado activo de infección.

Con base en lo anterior se justificó la realización un proyecto de investigación que busca un protocolo diagnóstico, con base en la utilización de hallazgos clínicos, pruebas hematológicas, serológicas y moleculares, que permitirán al clínico un adecuado diagnóstico, seguimiento clínico y terapéutica adecuada de los caninos. No se puede dar el diagnóstico de una enfermedad solo por signos clínicos y anamnesis, se debe tener la certeza de la presencia de la patología.

Se consideró la necesidad de realizar un adecuado uso e interpretación de las pruebas diagnósticas en los procesos rickettsiales en caninos de varias clínicas situadas en los municipios El Espinal y La Mesa (Cundinamarca, Colombia) cuyo clima tropical mantiene una temperatura uniforme la mayor parte del año. Se obtuvieron muestras de sangre en animales con anamnesis compatibles a estas enfermedades, a estas muestras se les realizó la prueba de PCR para determinar la presencia de la(s) bacterias en cada animal. Adicionalmente, se recibieron junto con las muestras, los resultados de cuadro hemático, prueba serológica detectora de anticuerpos y láminas de extendido sanguíneo de cada animal. Para poder describir un protocolo diagnóstico para estas enfermedades en los municipios mencionados, en los cuales no se ha desarrollado este tipo de trabajo, se debe tener en cuenta su geografía y clima, puesto que son áreas con alta población de garrapatas, y alta transmisión de enfermedades por estos vectores.

Dependiendo del tipo de infección rickettsial, puede ser un reto para los médicos veterinarios su diagnóstico, debido a las diferentes etapas de estas enfermedades y sus múltiples manifestaciones; se hace necesario para el clínico determinar el agente causal para su correcto seguimiento, tratamiento y control. Cabe anotar que *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* no son los únicos microorganismos que pueden desencadenar sintomatología como fiebre, decaimiento, anorexia, signos de sistema nervioso central, linfadenomegalia, pérdida de peso, entre otros.

Debido a que los vectores de las infecciones rickettsiales son las garrapatas, se estableció la presencia de uno o múltiples agentes causales (*Ehrlichia spp*, *Anaplasma spp* y *Rickettsia*) en éstas, mediante PCR, y se relacionó este resultado con el hospedador, pudiendo encontrar, o no, coinfecciones tanto en las garrapatas, como en los caninos estudiados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general.

Describir los estados de la infección en enfermedades rickettsiales, en caninos y en garrapatas, correlacionando e interpretando las pruebas diagnósticas más usadas en la clínica de pequeños animales, como cuadro hemático, extendido sanguíneo, prueba rápida SNAP, prueba molecular PCR y cuadro clínico asociado.

### 2.2. Objetivos específicos.

Detectar la posible infección de *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Rickettsia* y/o coinfecciones por medio de extendido sanguíneo, prueba serológica (prueba rápida de inmunocromatografía) SNAP y PCR.

Correlacionar las pruebas diagnósticas (SNAP y PCR) con cuadro clínico y hemograma de los perros estudiados.

Establecer la presencia o ausencia de uno o múltiples agentes rickettsiales en simultáneo, en garrapatas y en caninos, en los municipios del Espinal y La Mesa.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Enfermedades rickettsiales

Un número creciente de patologías rickettsiales se ha detectado en perros y humanos en las últimas décadas (Torres & Otranto, 2016). Las rickettsias son pequeñas bacterias Gram-negativas, que generalmente se comportan como intracelulares obligadas y se transmiten por medio de artrópodos (Akgöz, Mukundan, & Lee, 2012).

Como se enuncia, algunas bacterias tienen un estilo de vida intracelular obligado, que favorece su permanencia en vectores como las garrapatas y/o en uno o varios hospedadores vertebrados, es así como se puede encontrar en varias especies mamíferas y puede ser transmitida por diferentes géneros de garrapatas (Breitschwerdt, 2007).

Cuando se habla de enfermedad “rickettsial” se refiere a la infección con organismos pertenecientes al género *Rickettsia*. Anteriormente, se utilizaba este término para describir las patologías causadas por organismos pertenecientes a la familia Rickettsiaceae, en la cual, actualmente solo encontramos *Rickettsia* y *Orientia*, que son bacterias que viven libres en el citoplasma o en el núcleo de las células huésped (Kidd & Breitschwerdt, 2011). Con base en varios análisis de ARNr de choque térmico y de proteínas de superficie, se ha determinado una nueva clasificación de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Breitschwerdt, 2007), ver figura 1. Los autores Ciccuttin, Vidal y otros, en el año 2014 elaboraron un árbol filogenético con un análisis basado en la comparación de secuencias del gen groESL de la familia *Anaplasmataceae*, evidenciándose en este trabajo que las secuencias obtenidas son similares a las de regiones geográficas diferentes al municipio de Bahía Blanca en Argentina. Adicionalmente concluyen la presencia de *R. massiliae* en garrapatas *R. sanguineus* en una segunda zona en el mismo país, y confirmaron la infección con *A. platys* en caninos (Figura 2).

En la actualidad *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, pertenecen a la familia Anaplasmataceae en el orden Rickettsiales, el cual incluye organismos intracelulares que residen dentro de las vacuolas de las células hematopoyéticas como eritrocitos, monocitos, neutrófilos y plaquetas (Kidd & Breitschwerdt, 2011).

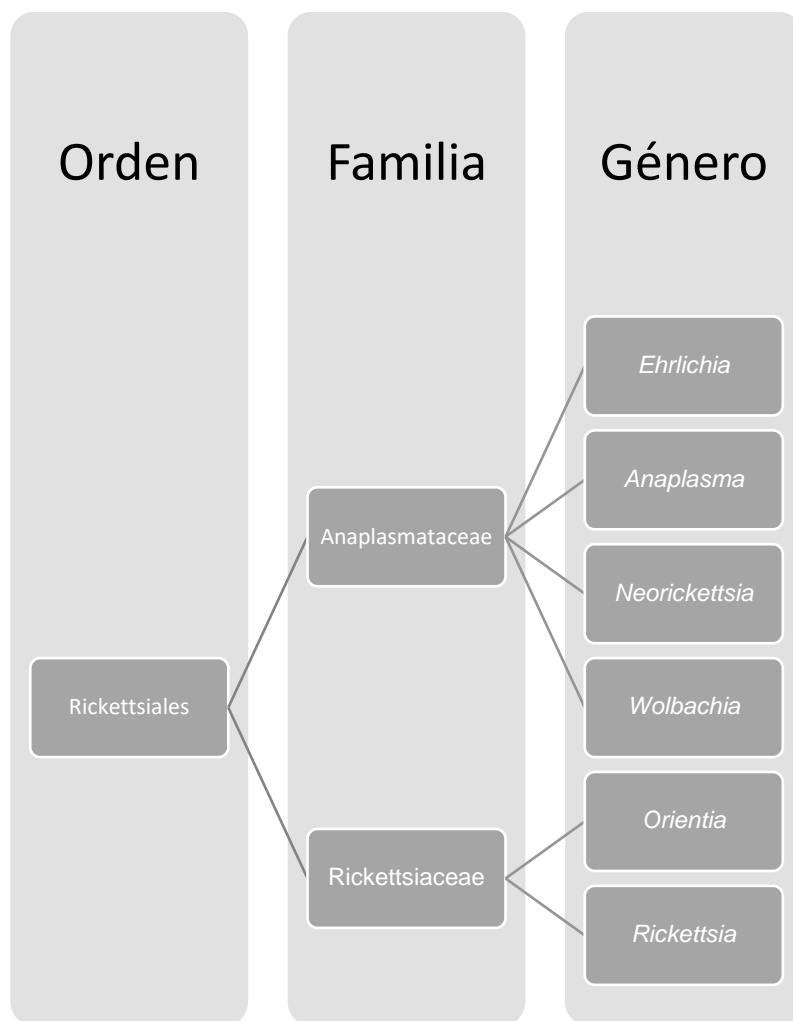


Figura 1. Organigrama donde se puede observar la clasificación del orden Rickettsiales, la cual se compone por bacterias Gram-negativas intracelulares obligadas. Figura realizada con base en (Guillemi, Tomassone, & Farber, 2015)

### 3.1.1. Ehrlichiosis canina

En la actualidad y gracias a los análisis genéticos que se han mencionado anteriormente, el género *Ehrlichia*, está ahora formado por *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminatum*. Adicionalmente, Vargas y otros autores en el 2012, muestran la posición filogenética de una *Ehrlichia canis* encontrada en caninos de Colombia, basado en secuencias del gen 16S de ARNr (Figura 3). Por otro lado, *E. risticii* ha sido transferida al género *Neorickettsia* y *E. equi* junto con *E. phagocytophila* son ahora *Anaplasma phagocytophilum* (Breitschwerdt, 2007).

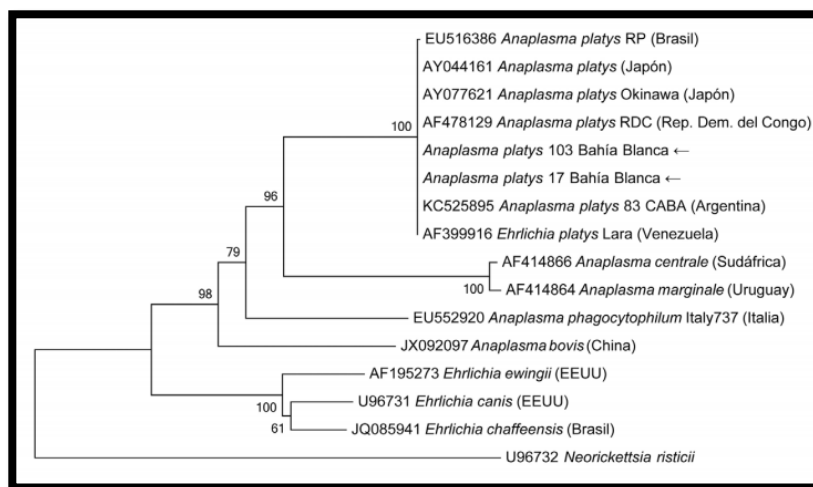


Figura 2. Árbol filogenético inferido por la comparación de secuencias parciales del gen groESL de la familia Anaplasmataceae (Cicuttin, Vidal, De Salvo, Beltrán, & Gury, 2014).

La enfermedad fue identificada inicialmente por Donatien y Lestoquard en Argelia en 1935 (Harrus & Waner, 2011; Dahmania, y otros., 2015). La ehrlichiosis en perros puede ser causada por:

- *Ehrlichia canis*
- *Ehrlichia chaffeensis*
- *Ehrlichia ewingii*
- *Ehrlichia ruminatum* (Breitschwerdt, 2007).

*E. canis* es el primer agente que se describió en la ehrlichiosis canina y sigue siendo hoy en día un importante patógeno en perros, siendo responsable de esta grave enfermedad que amenaza la vida (Vargas , y otros,, 2012; Litle, 2010). Además de ser el primer agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina (EMC), comparándola con otras especies de *Ehrlichia*, la *E. canis* provoca una enfermedad más severa en los perros. En los Estados Unidos se reportó la EMC por primera vez en 1963. En la actualidad, la enfermedad se distribuye ampliamente en todo el mundo, en especial en las zonas tropicales y subtropicales (Rar & Golovljova, 2011).

*E. chaffeensis* es más conocido como el agente de la ehrlichiosis monocitotrópica humana en el sur de los Estados Unidos, pero también afecta a los perros, produciendo una enfermedad relativamente leve; sin embargo, cuando hay coinfección con otros agentes de *Ehrlichia*, los perros pueden ser afectados más gravemente (Litle, 2010).

*E. ewingii* fue descrita por primera vez en un perro con enfermedad febril en 1971, desde entonces se sabe que es capaz de infectar y causar enfermedad en perros y personas (Litle, 2010). Históricamente las especies de *Ehrlichia* se designaron según su tropismo celular (monocitos, granulocitos y plaquetas) (Breitschwerdt, 2007).

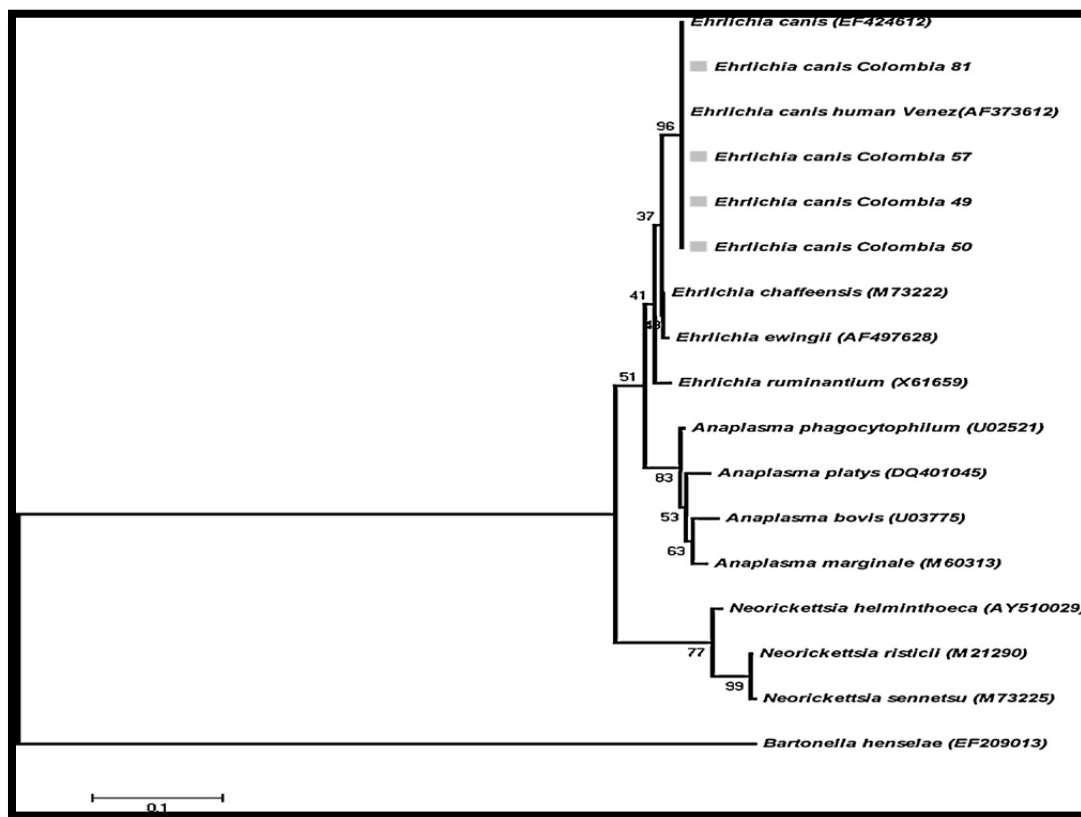


Figura 3. Posición filogenética de *Ehrlichia canis* basados en secuencias en 16S ARNr (Vargas , y otros., 2012). Encontrada en caninos de Colombia.

### 3.1.1.1. Epidemiología.

En Medellín (Antioquia) se realizó un estudio de seroprevalencia de *Ehrlichia canis*, en perros con sospecha de infecciones transmitidas por garrapatas, desde el año 2012 hasta el 2014; esta investigación se realizó por medio de análisis serológicos en búsqueda de anticuerpos, encontrando que de las 781 muestras analizadas, los perros con más resultados positivos fueron mestizos con un 13,2%, siguiendo la raza french poodle con 11,3% y labradores con un 10,9%. En este trabajo la seroprevalencia global de la infección fue de 24,8% (Cartagena, Ríos, & Cardona, 2015). El valor de la seroprevalencia concuerda con varias realizadas anteriormente,



como en Montería (Colombia) en el 2006, que fue del 27%, y otros países como Israel, México, Perú y Brasil entre 16,5% - 33.1% (Cartagena, Ríos, & Cardona, 2015).

Debido a que es un porcentaje significativo, al analizar el anterior estudio se concluye, la necesidad de intervenir esta enfermedad con diferentes medidas de salud pública, y revisar el manejo que se le da en la clínica a estas infecciones, desde su diagnóstico hasta su tratamiento y control.

Los organismos de *Ehrlichia* son transmitidos a los mamíferos a través de las glándulas salivales de las garrapatas (Ramsey, Gunn-More, & Shaw, 2012). Los caninos sirven como un huésped reservorio clave para *E. canis*, así como huésped de mantenimiento de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* que es el vector primario de la *E. canis* (Figura 4). Los estados inmaduros de *R. sanguineus* se infectan cuando se alimentan de un perro rickettsémico, manteniendo la infección en las diferentes etapas de la garrapata, y permitiendo la transmisión de la bacteria cuando este ectoparásito se alimenta de nuevo, ya sea como ninfa o como adulto (Little, 2010). Sin embargo, curiosamente, *E. canis* puede ser transmitida también por *Dermacentor variabilis* (Nicholson, y otros., 2010) (Figura 5).



Figura 4. *Rhipicephalus sanguineus*, la garrapata marrón del perro, editado de (Little, 2010)

Mientras que la naturaleza del ciclo de *E. chaffeensis* involucra al venado de cola blanca como huésped reservorio primario y a la garrapata *Amblyomma americanum* como vector primario, los perros adquieren el patógeno cuando una ninfa o adulto de *A. americanum* infectada se alimenta de ellos, por esto es común la enfermedad en los caninos que viven o andan de paso en zonas con altas poblaciones de *A. americanum* (Figura 6) (Litle, 2010). Sin embargo, los perros pueden ser infectados también de *E. chaffeensis* por medio de *D. variabilis* y por *R. sanguineus* (Litle, 2010; Nicholson , y otros, 2010).

La infección por *Ehrlichia spp* puede ocurrir también por inoculación de sangre contaminada, ya que los organismos sobreviven y siguen siendo infecciosos en sangre entera refrigerada, lo que sugiere la infección por transfusiones de sangre o agujas contaminadas, aunque sería muy poco común (Litle, 2010).



Figura 5. *Dermacentor variabilis*, garrapata americana del perro (Blagburn & Dryden, 2009).

Según Susan Little en el 2010, las garrapatas que son vectores de *Ehrlichia spp* (*R. sanguineus*, *A. americanum* y *D. virabilis*) son más activos en primavera y verano en países de estaciones, por lo tanto, en estas épocas se ven más perros infectados con *Ehrlichia spp*.

En Colombia, debido a los cambios climáticos que se han venido manifestando con aumentos de temperatura desde los años sesenta (con más significancia desde los años 80 – 90), aumentos históricos de temperaturas medias, máximas y mínimas en la primera década del siglo XXI, y la reducción de las precipitaciones, se puede pensar que es un factor que predispone a la variación y aumento de la distribución geográfica de garrapatas y su picadura (Acero, Calixto, & Prieto, 2011). Por lo tanto, en la actualidad, se ha vuelto un problema de salud pública, ya que se puede decir que no solo se establecen las garrapatas en los lugares donde históricamente lo hacían, sino también donde habitualmente no había, siendo un vector de zoonosis virales, parasitarias y bacterianas en las comunidades humanas.

### 3.1.1.2. Patogenia y signos clínicos.

En caninos se han identificado especies de *Ehrlichia* específicas parasitando monocitos, granulocitos y plaquetas (Ramsey *et al.*, 2012). Los organismos del género *Ehrlichia*, son un grupo de bacterias patógenas intracelulares que viven en vacuolas en racimo o mórulas (Figura 7) dentro de las células hematopoyéticas (Kidd y Breitschwerdt, 2011). Estas bacterias presentan la particularidad de ser capaces de replicarse dentro de los dos anfitriones, es decir, dentro del huésped mamífero y en el vector, además de desarrollar estrategias para persistir y luego infectar a sus huéspedes naturales (Moumene & Meyer, 2016).

El curso de esta enfermedad puede ser de tres formas: aguda, subclínica y crónica (Ramsey, y otros., 2012; Carmo, y otros, 2015). En un estudio en el 2011, Kidd y Breitschewerd, determinaron un aumento en la susceptibilidad del pastor alemán a la infección de *Ehrlichia* y que la variabilidad en la manifestación de la enfermedad clínica es probablemente causada por diferentes cepas de *E. canis*, la presencia de agentes coinfectantes, el estado inmune del canino y factores genéticos del huésped.

Existen varias etapas en el proceso de invasión de *E. canis* en las células huésped (Harrus, 2015):

- Adhesión.
- Internalización.
- Proliferación intracelular.
- Exocitosis.
- Propagación intercelular.

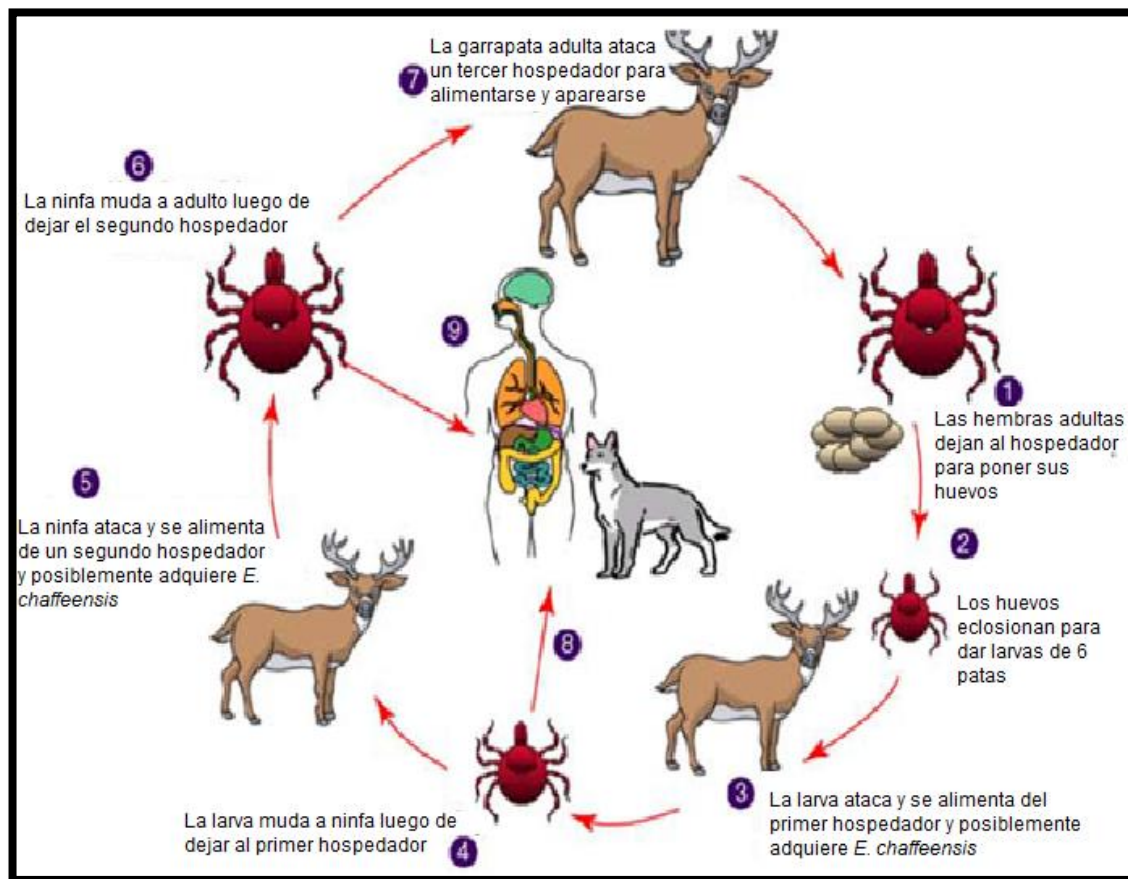


Figura 6. Etapas de *A. americanum*, vector principal de *E. chaffeensis* se alimenta de ciervos como huésped preferido. La infección de *E. chaffeensis* se adquiere durante la alimentación de larvas o ninfas de *A. americanum* y posteriormente es transmitida durante la alimentación de ninfas o adultos (modificado de: Nicholson, y otros., 2010).

Varias proteínas externas de membrana de *E. canis*, incluyendo la glicoproteína GP19, GP36 y GP140, están asociadas con la adherencia e internalización en la célula huésped (Harrus, 2015), además el aporte de calcio y hierro en el citoesqueleto de actina parece participar en el proceso de difusión intercelular de la bacteria (Alves y otros, 2014)

Después de la transmisión hay un período de incubación de 8 a 20 días, el cual, se produce antes de que aparezcan los signos clínicos (Kidd y Breitschwerdt, 2011; Ramsey y otros, 2012). Puede existir una infección subclínica, la cual es común y puede persistir por muchos años (estos animales son asintomáticos). “Si no aparece una respuesta inmune efectiva, se desarrolla ehrlichiosis crónica, y esta se asocia con una lesión grave de la médula ósea en animales sensibles” (Ramsey y otros, 2012). La fase aguda de la enfermedad dura de 2 a 4 semanas (Kidd y Breitschwerdt, 2011) y los animales con esta fase pueden presentar anorexia, letargo, fiebre, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, pérdida de peso, hematomas, hemorragias petequiales, trastornos cardio respiratorios, congestión de la esclerótica, descarga oculonasal, trombocitopenia y leucopenia seguida de leucocitosis (Carmo, y otros, 2015; Kidd & Breitschwerdt, 2011).

Varias especies de *Ehrlichia* pueden infectar células mononucleares así como lo hacen *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. risticii* (actualmente *Neorickettsia*) (Breitschwerdt, 2007) y otras especies como la *E. ewingii* y la que anteriormente se conocía como *E. phagocytophilia* (Bird, 2011), que ahora es *Anaplasma phagocytophilum* (Breitschwerdt, 2007), pueden infectar los granulocitos; por último, las plaquetas pueden ser infectadas por *E. platys* o raramente *E. chaffeensis* (Bird, 2011).



Figura 7. Mórula de *E. ewingii* en el citoplasma de un neutrófilo en la sangre de un perro infectado. Modificado de (Harvey, 2012a).

La hematología de estos caninos comúnmente revela una trombocitopenia y una anemia no regenerativa. La infección con *Ehrlichia*, en especial *E. canis* a menudo conduce a un aumento del consumo de plaquetas y una disminución de la supervivencia de plaquetas por vasculitis y mecanismos inmunes, pudiendo ocasionar así epistaxis, hemorragia gingival, hemorragia retiniana, melena, petequias, equimosis y sangrado prolongado en los sitios de incisión quirúrgica o de venopunción (Bird, 2011).

En un estudio en el 2015, Carmo en colaboración con otros autores, concluyen que los perros infectados naturalmente por *E. canis* mostraron dos fases de la enfermedad. Donde los perros con enfermedad aguda mostraron una disminución del hematocrito en comparación a los que presentaron una forma subclínica de la infección. Adicionalmente señalan como dato de interés que más del 40% de los perros que tenían una fase aguda de la patología tenían garrapatas en el momento del estudio.

Las cepas más patógenas de *E. canis* parasitan linfocitos y monocitos (Figura 8), mientras que las cepas menos fuertes se multiplican en eosinófilos (Storz, 1990). Adicionalmente Storz en

1990, afirma que las infecciones en los perros producidas por *E. canis* se caracterizan por un largo curso de fiebres recurrentes, secreción nasal, tendencias al sangrado, depresión y pérdida de peso. Otro signo de la *E. canis* es que disminuye la producción de plaquetas, aunque hay también una destrucción de plaquetas mediada por el sistema inmune, lo que contribuye a la trombocitopenia en la ehrlichiosis (Harvey, 2012b). También se puede encontrar disfunción plaquetaria que causa petequias (Figura 9) y epistaxia (Figura 10) marcadas, así como leucopenia y anemia variable (Ramsey, y otros., 2012). En marzo del 2016, Bottari junto con otros autores, mencionan dentro de los resultados de su estudio, que fue posible observar que animales con fase aguda de ehrlichiosis monocitotrópica canina, tuvieron una disminución significativa en los eritrocitos, hematocrito, hemoglobina y plaquetas, en comparación con animales sanos. Adicionalmente, no observaron diferencias significativas entre los caninos con enfermedad subclínica y los sanos (Bottari, y otros., 2016). Adicionalmente Harrus afirma en el 2015, que el estado agudo y el subclínico de la ehrlichiosis monocítica canina son curables si se tratan adecuadamente, mientras que el estado crónico generalmente no tiene cura y su pronóstico es grave.

En la ehrlichiosis monocítica y granulocítica, normalmente se encuentran signos no específicos de enfermedad como fiebre, anorexia, linfadenomegalia, descarga oculonasal, uveítis, y signos del sistema nervioso central (convulsiones, estupor) (Ramsey y otros, 2012). Las lesiones oftalmológicas son comunes incluyendo dentro de ellas uveítis anterior, coriorretinitis, papiledema, hemorragia retiniana, presencia de infiltrados perivasculares de la retina y desprendimiento de la retina (Harrus y Waner, 2011).

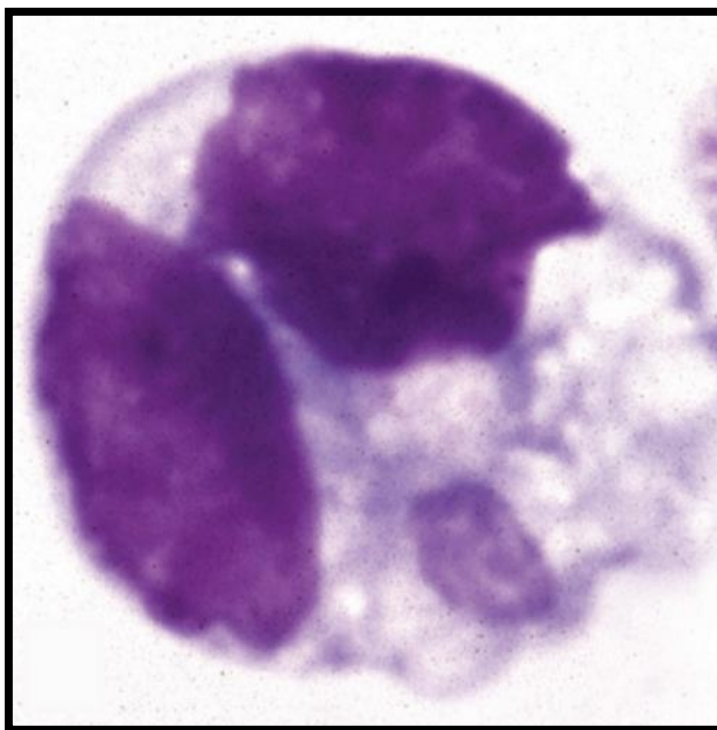


Figura 8. Mórula de *E. canis* en el citoplasma de un monocito canino. *Modificado de (Harvey, 2012a).*



Figura 9. Petequias numerosas en parte ventral del abdomen debidas a una trombocitopenia. Tomado de [www.ortocanis.com](http://www.ortocanis.com)



La ehrlichiosis granulocítica, causada por la *E. ewingii*, que infecta los neutrófilos y raramente los eosinófilos, puede presentarse con poliartritis neutrofílica, mostrando signos como, cojera, inflamación articular y edema de las extremidades, siendo estos signos muy marcados. Adicionalmente, la infección crónica por *E. canis*, causa pancitopenia debido a la hipocelularidad de la médula ósea (Harrus, 2015). La aparición de los signos puede desencadenarse por enfermedades concurrentes como la leishmaniosis, la babesiosis u otras infecciones transmitidas por garrapatas (Bird, 2011; Ramsey, y otros, 2012).

### 3.1.1.3. Diagnóstico.

El diagnóstico de la ehrlichiosis inicia observando signos clínicos compatibles en un animal que dentro de la anamnesis incluya viajes a zonas endémicas de garrapatas o con presencia de éstas en el canino; adicionalmente, se puede confirmar la identificación de las mórulas de *Ehrlichia spp* en los leucocitos o plaquetas en las extensiones de la capa blanca concentrada o de sangre de los capilares del canino; estas mórulas se pueden observar generalmente en las infecciones agudas (Kidd y Breitschwerdt, 2011). Estos microorganismos pueden ser fácilmente confundidos con otros, como *Anaplasma spp*, en un extendido sanguíneo debido a su similitud (Figura 7, 8 y 12). Sin embargo, este tipo de diagnóstico no garantiza su identificación, debido a que la presencia de estas mórulas es transitoria y la sensibilidad de esta prueba es muy baja, ya que depende de la experiencia del clínico o técnico que la realiza y otras variables, como el momento y lugar anatómico del que es tomada la muestra. Los aspirados de tejido del bazo, pulmón o nódulos linfáticos, pueden usarse también para la identificación de esta *Rickettsia* (Ramsey *et al.*,2012).

El diagnóstico de la enfermedad se confirma generalmente usando la detección de anticuerpos y normalmente se lleva a cabo utilizando la prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) (en la práctica clínica se conoce como test rápido de inmunocromatografía detectora de anticuerpos); actualmente se encuentra el diagnóstico molecular por PCR (Waner, Harrus, Jongejan, Bark, Keysary y Cornelisen, 2001; Tanikawa, y

otros, 2013)). Estas pruebas IFA están ampliamente disponibles a través de los laboratorios de diagnóstico y comúnmente se encuentran reacciones cruzadas entre *E. canis* y *A. phagocytophilum* (Little, 2010).

Se puede concluir que el médico veterinario debe sospechar de la ehrlichiosis monocítica canina, cuando hay una anamnesis compatible (animales que viajan a zonas endémicas o que hayan sido expuestos a las garrapatas), que tenga signos clínicos típicos (mencionados anteriormente), características hematológicas claras de la enfermedad. Adicionalmente hay técnicas de diagnóstico tradicionales (hematología, citología, serología y aislamiento), que son herramientas de diagnóstico valiosas para la ehrlichiosis monocítica canina; sin embargo, un diagnóstico definitivo de *E. canis* requiere de técnicas moleculares (Harrus y Waner, 2011).

#### **3.1.1.4. Tratamiento.**

Se basa en apoyo del animal con fluidoterapia, e incluso transfusión sanguínea de ser necesario. Adicionalmente se puede implementar terapia con glucocorticoides, en los casos en los que hay artritis inmunomediadas. Varios medicamentos incluyendo las tetraciclinas (como, clortetraciclina, oxitetraciclina, minociclina, doxiciclina), macrólidos (azitromicina), fluoroquinolonas (enrofloxacina), cloranfenicol, rifampicina, dipropionato de imidocarb, han sido investigados como agentes quimioterapéuticos contra *E. canis*. Con la excepción de las tetraciclinas y el cloranfenicol, estos agentes han dado muy malos resultados. (Harrus, 2015).

El tratamiento más recomendado es el uso de doxiciclina como antibiótico; otro medicamento que se recomienda para tratar este tipo de infecciones es el imidocarb (Ramsey, Gunn-More, & Shaw, 2012). En un estudio en el que se trataron con doxiciclina con dosis de 10mg/kg a 20 caninos enfermos con ehrlichiosis monocítica canina y 12 perros sanos, se demostró que el tratamiento con doxiciclina dio como resultado un aumento del recuento de plaquetas y eritrocitos en los perros enfermos, mientras el aumento en el conteo de eritrocitos y aumento de la concentración de hemoglobina no se produjo en perros sanos, lo cual sugiere que este efecto está directamente relacionado con el efecto antimicrobiano de la doxiciclina sobre la *E. canis*; sin embargo el recuento de plaquetas, la hemoglobina corpuscular media y la concentración media

de hemoglobina corpuscular, aumentó progresivamente tanto en perros enfermos como en perros sanos luego de la administración de doxiciclina, lo cual sugiere un efecto específico de esta tetraciclina sobre la proliferación de plaquetas y en la concentración de la hemoglobina corpuscular (Villaescusa, García, Rodríguez, Tesouro, & Sainz, 2015). En algunos animales se necesita tratamiento de apoyo, como sueroterapia, transfusiones sanguíneas, vitaminas y esteroides anabólicos, sobre todo caninos con condición corporal pobre y con deficiencias nutricionales debido a la anorexia o disorexia (Breitschwerdt, 2007).



Figura 10. Perro con severa epistaxis causada por infección de *E. canis*. (Little, 2010)

### 3.1.2. Anaplasma.

*Ehrlichia phagocitophila* y *E. equi* son llamadas actualmente como *Anaplasma phagocytophilum* que es una bacteria granulocítica, fue descrita por primera vez en 1940 (Woldehiwet, 2010). Los perros pueden ser infectados tanto con *A. phagocytophilum* como con *A. platys*, siendo los primeros informes de *A. phagocytophilum* en perros en California a principios de 1980. *A. platys* fue descrita en perros inicialmente en Estados Unidos en 1978 y desde entonces ha sido reconocida mundialmente (Litle, 2010; Woldehiwet, 2010). Uno de los estudios sobre *Anaplasma* indica que las variantes de *A. phagocytophilum* que infectan a los rumiantes en Europa podrían ser diferentes a las variantes que infectan perros, caballos y seres humanos (de la Fuente, y otros, 2005 citado en (Woldehiwet, 2010)). Las enfermedades causadas por *A. phagocytophilum* incluyen la anaplasmosis humana granulocítica, anaplasmosis granulocítica equina y canina, además de la fiebre transmitida por garrapatas en rumiantes (de la Fuente, Estrada, Cabezas , y Kocan, 2015). *A. platys* era anteriormente conocida como *E. platys*, esta bacteria infecta las plaquetas y es el agente causal de la trombocitopenia cíclica canina (CCT) y también se ha identificado en gatos, zorros y en seres humanos (Almazán, y otros, 2015).

#### 3.1.2.1. Epidemiología.

Al parecer *A. phagocytophilum* puede variar sus huéspedes según la región geográfica en donde se encuentre, además la gravedad y la incidencia parecen variar también dependiendo de su cepa o variante (de la Fuente, Estrada, Cabezas , & Kocan, 2015).

El ciclo de infección de *A. phagocytophilum* depende de reservorios vertebrados infectados y del vector, en este caso garrapatas del género *Ixodes* (Figura 11). Esta bacteria, inicialmente afecta las células del intestino medio de las garrapatas y posteriormente se desarrolla en sus glándulas salivales para la transmisión a huéspedes susceptibles durante su alimentación. Cuando ha infectado al huésped, *A. phagocytophilum* infecta las células granulocíticas, principalmente neutrófilos (de la Fuente, y otros, 2015). Mientras el vector de *A. platys* parece ser *R. sanguineus*, sin embargo, no está claro aún (Almazán, y otros, 2015). Los seres humanos se

consideran huéspedes accidentales y su infección se denomina anaplasmosis granulocítica humana, es por esta razón que tiene importancia zoonótica (Lee, y otros, 2016).

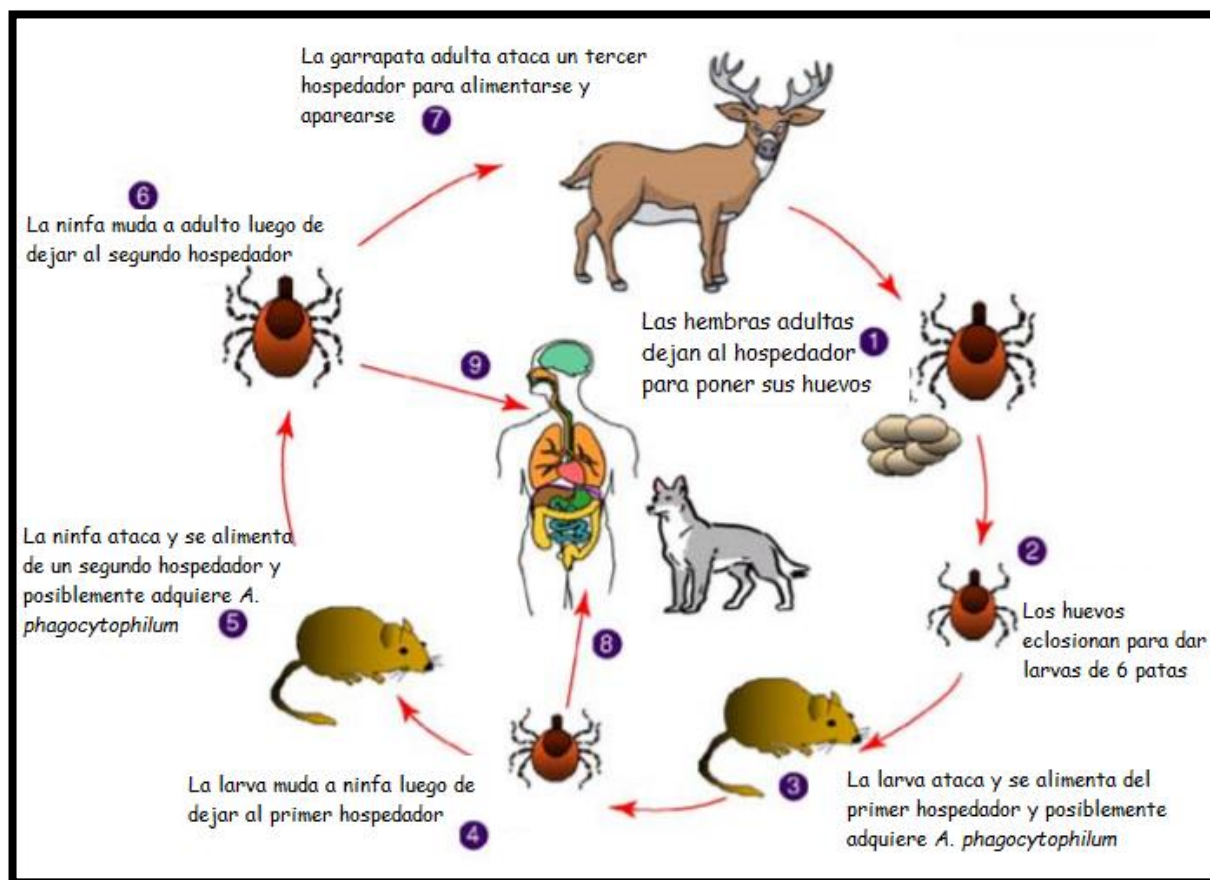


Figura 11. Ciclo de transmisión de *A. phagocytophilum*. El patógeno se adquiere de roedores sigmodontinos u otros reservorios durante la alimentación de larvas o ninfas de garrapatas *Ixodes spp* y se transmiten en las tomas posteriores de ninfa o adultos. Modificado de (Nicholson, y otros, 2010).

### 3.1.2.2. Patogenia y signos clínicos.

Las primeras etapas de la enfermedad no están bien descritas aún, por ejemplo, la forma en la que se reproducen las bacterias luego de entrar por la dermis durante la picadura de la garrapata, y lo que sucede antes del período de bacteremia (comienza 4 a 7 días después del ingreso de la bacteria al organismo).

Durante el período de bacteremia las principales células blanco de *A. phagocytophilum* son los eosinófilos, neutrófilos y monocitos, siendo estos últimos infectados en la etapa final de la bacteremia inicial y los predominantes en fases tardías de bacteremia (Woldehiwet, 2010).

El *A. phagocytophilum* se desarrolla dentro de las inclusiones de membrana en el citoplasma de la célula huésped (figura 14). Su adaptación para infectar a un diverso grupo de garrapatas y de huéspedes depende de varias estrategias (Figura 14), como remodelación del citoesqueleto, inhibición de apoptosis de las células, y manipulación de la respuesta inmune por medio de proteínas rickettsiales implicadas en la infección, entre otras (de la Fuente, y otros, 2015).

La remodelación del citoesqueleto se efectúa a través de la reorganización de la actina o aumento de la cantidad de espectrina. *A. phagocytophilum*, además, inhibe la apoptosis a través de mecanismos como la activación de transductores de janus quinasas/activadores de señal de transducción (JAK/STAT) (de la Fuente, y otros, 2015).

De los principales efectos de la infección con *A. phagocytophilum* en perros son leucopenia y trombocitopenia (Woldehiwet, 2010). Los signos clínicos en la infección con *A. phagocytophilum* son muy similares a los de *Ehrlichia*, temperatura mayor de 39°C, anorexia, depresión, letargo, esplenomegalia, puede haber en algunos casos claudicación debido a poliartritis, diarrea, y signos neurológicos (Little, 2010). “Cambios adicionales reportados incluyen Linfopenia, anemia leve, que puede ser o no regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia y aumento de fosfatasa alcalina” (Little, 2010).

La anaplasmosis causada por *A. platys* introduce una trombocitopenia recurrente que aumenta y disminuye en ciclos aproximados de 10 a 14 días durante la infección aguda; también

se han reportado tendencias hemorrágicas y uveítis anterior bilateral (Breitschwerdt, 2007). Hay reportes que indican que las cepas en España y en Chile suelen ser más patógenas que en Norte América. La enfermedad es más común en perros que además se han infectado con otros agentes transmitidos por garrapatas como *E. canis*. Algunos trabajos demostraron que la coinfección de *A. platys* y *E. canis* produce una anemia y trombocitopenia más severas que la infección solo por uno de los agentes (Little, 2010). *A. platys* causa la trombocitopenia cíclica canina, y se replica únicamente en las plaquetas (Breitschwerdt, 2007).

### 3.1.2.3. Diagnóstico.

Se puede observar al microscopio *Anaplasma phagocytophilum* en vacuolas citoplasmáticas, conteniendo múltiples bacterias basofílicas cocoides a elipsoides (Figura 12);, estos microorganismos son más oscuros que los corpúsculos de Dohle (que indican cambios tóxicos) y su presencia en grupo ayuda a diferenciar este de otros microorganismos (Dolz, y otros, 2013).

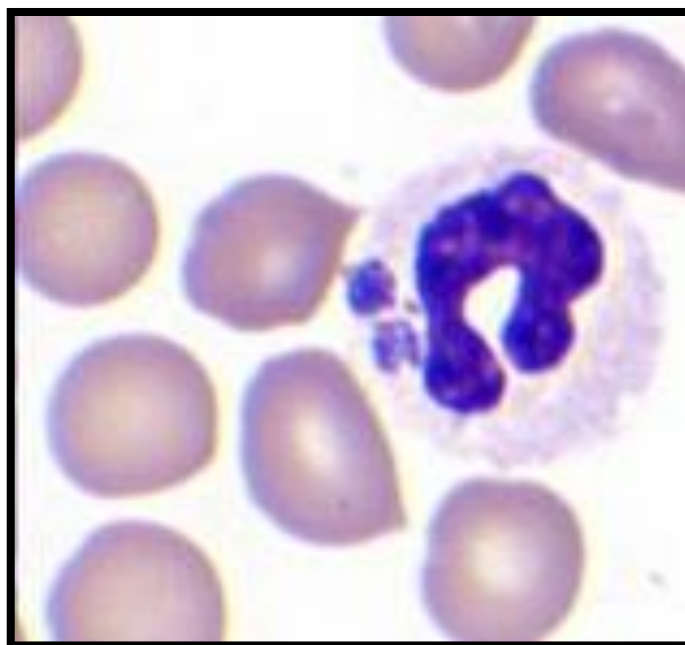


Figura 12. *Anaplasma phagocytophilum* en un perro de montaña Bernés de 5 años de edad. Recuperado de (Vetpraxis, 2010).

Tanto *Anaplasma* y *Ehrlichia* pueden infectar a los neutrófilos y eosinófilos y tienen características morfológicas similares; el diagnóstico molecular por reacción en cadena de polimerasa PCR y análisis de secuencias de genes son necesarios para diferenciar estos dos microorganismos (Dolz, y otros, 2013).

Para obtener información sobre la exposición a *A. phagocytophilum*, ya sea pasada o presente, se realizan análisis serológicos; los resultados deben ser interpretados con precaución ya que no necesariamente está presente el patógeno, si los resultados de serología son positivos (Lee, y otros, 2016).

En un estudio en el que analizaron las proteínas séricas, los complejos inmunes y proteinuria en perros naturalmente infectados con *A. phagocytophilum*, encontraron que la trombocitopenia es una de las características de la anaplasmosis aguda, mostrando una asociación estadísticamente significativa entre la trombocitopenia y la hipoalbuminemia, la hipo- $\alpha$ 1-globulinemia y la hipergammaglobulinemia (Figura 13) (Ravnik, Premrov, Lusa, & Tozon, 2014).

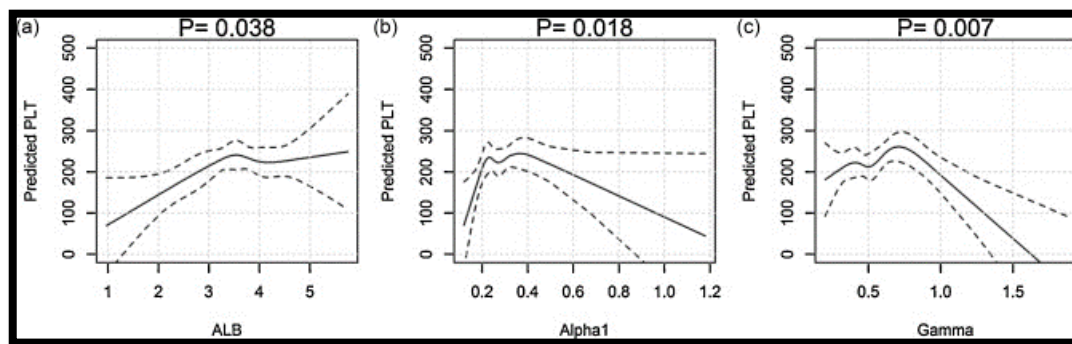


Figura 13. Correlación entre la trombocitopenia y la hipoalbuminemia, hipo- $\alpha$ 1-globulinaemia y hipergammaglobulinemia. Donde PLT son las plaquetas; ALB, es la albúmina; Alfa 1, alfa-1-globulinas; gamma, gamma-globulinas y P, el valor de probabilidad. Tomado de (Ravnik, y otros, 2014)



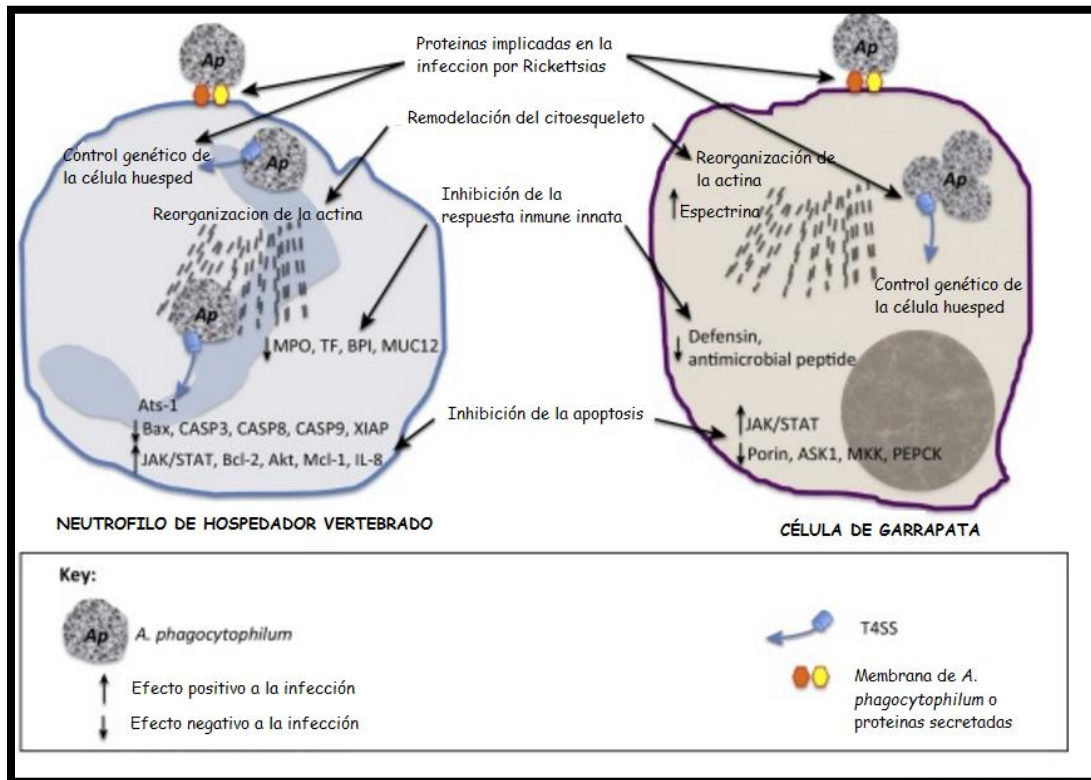


Figura 14. Estrategias de *A. phagocytophilum* comunes para establecer la infección en huéspedes vertebrados y en garrapatas. Tomado de (Litle, 2010).

#### 3.1.2.4. Tratamiento.

Así como ocurre en la ehrlichiosis, en la anaplasmosis, el tratamiento de elección es la doxiciclina. Las fluoroquinolonas incluyendo la enrofloxacina, no son eficaces para *Ehrlichia* spp, pero si puede tener eficacia contra *A. phagocytophilum*. La rifampicina por otro lado, ha sido utilizada con éxito para tratamiento de infecciones con *A. phagocytophilum* en personas (Little, 2010). Hay poca información específica sobre tratamiento contra anaplasmosis en caninos, sin embargo, en junio del 2015 Bakken y Dumler, en su artículo “Human Granulocytic Anaplasmosis”, afirman que hay investigaciones que indican que *A. phagocytophilum* es sensible a las tetraciclinas. En especial la doxiciclina, es el antibiótico que más se utiliza para esta

patología, se usa dosis de 5mg/kg, cada 12 horas durante 2 semanas en caninos, mostrando una mejoría clínica a las 24 a 48 horas de comenzar el tratamiento (Carrade, Foley, Borjesson, & Sykes, 2009).

### **3.1.3. Fiebre exantemática de las montañas rocosas.**

Su agente causal es *Rickettsia rickettsii*. Es transmitida también por garrapatas y es contagiada a caninos, humanos y otros vertebrados. Las alteraciones clínicas asociadas a esta enfermedad comprenden fiebre, anorexia, depresión, secreción ocular mucopurulenta, hiperemia de la esclerótica, taquipnea, tos, vómito, diarrea, dolor muscular, poliartritis neutrófila y un diverso grupo de signos neurológicos, como hiperestesia, ataxia, signos vestibulares, estupor, convulsiones y coma (Breitschwerdt, 2007). La infección con *R. rickettsii* causa una enfermedad extremadamente grave y potencialmente mortal en seres humanos y caninos.

#### **3.1.3.1. Epidemiología.**

Su principal vector es la garrapata *Dermacentor* spp, la cual adquiere la *R. rickettsii* cuando se alimenta de roedores. En América del Sur la infección se adquiere por *D. cajennense*, la cual, ha sido implicada en la transmisión a seres humanos y caninos (Nicholson , y otros., 2010).

El ciclo natural de *R. rickettsii* se mantiene en poblaciones de garrapatas persistentemente infectadas y reservorios pequeños como roedores. La infección transovárica de hembras garrapata infectadas a los huevos y la transmisión durante el apareamiento en adultos, puede mantener la infección en la población sin alimentarse de algún animal infectado. La enfermedad ha sido reportada además en seres humanos en todo el continente (América del norte, Centro América y América del Sur) (Nicholson, y otros, 2010).

### 3.1.3.2. Patogenia y signos clínicos.

La incubación dura de 2 a 14 días luego de la inoculación de la bacteria. Generalmente los signos comienzan 4 a 5 días después de la picadura de la garrapata infectada, con temperaturas corporales altas, desde 39,2°C a 40,5°C, adicionalmente se pueden presentar petequias y equimosis en mucosas orales, oculares y genitales. También puede haber hemorragias retinianas focales. Hay otros signos que pueden aparecer como edemas en las extremidades, en labios, pabellones auriculares, prepucio y escroto. En fases tardías de la enfermedad o durante la recuperación, puede producirse necrosis de las extremidades en los caninos (Warner & Marsh, 2002).

### 3.1.3.3. Diagnóstico.

Los ensayos serológicos son las pruebas diagnósticas más disponibles, sin embargo, hay una considerable reactividad cruzada entre las diferentes rickettsias, y para evitar el retraso del inicio del tratamiento, el diagnóstico provisional puede hacerse sobre la base de la compatibilidad clínica, la historia, la presencia de garrapatas en el animal y los indicadores epidemiológicos tanto regionales como del país. Un único título elevado de IgM en un canino clínicamente compatible puede ser suficiente para su comprobación. Sin embargo, si se está detectando IgG canina por *Rickettsia* spp, se debe tener en cuenta que esta puede persistir hasta por 10 meses, es decir, que la detección de IgG por sí sola no puede ser clínicamente relevante (Fritz, 2009). Por otro lado, los hallazgos de laboratorio clínico anormales, pueden incluir: hipoalbuminemia, leucocitosis moderada y trombocitopenia (Warner & Marsh, 2002).

### 3.2. Garrapatas.

En Colombia, se han realizado varias investigaciones que estudian la prevalencia de garrapatas en el país y la variación y distribución geográfica de las garrapatas debido al cambio climático. Cerca de Bogotá se ha documentado la presencia de *Amblyoma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Anocentor nitens* con prevalencia de *Ehrlichia spp* y *Rickettsia spp* en caninos y equinos (Acero, Calixto, & Prieto, 2011).

En un estudio realizado en el 2015 por Almazán junto con otros autores, se concluyó que entre el 20% y 59% de los perros que asistían a clínicas en el centro y noreste de México estaban infestadas con *R. sanguineus*, por lo que creen que este puede ser el vector de *E. canis* y *A. platys* en estas regiones (tropicales y subtropicales) (Almazán, y otros, 2015).

Las garrapatas son artrópodos que con otros invertebrados como insectos, arañas, ácaros y crustáceos pertenecen al Phylum Arthropoda, que se divide en dos subphylum: Mandibulata y Chelicerata (Faccioli, 2011). Las garrapatas, pertenecen a la clase Arachnida dentro del subphylum Chelicerata (Fritz, 2009; Faccioli, 2011). La clase agrupa al Orden Acari y dentro de éste al suborden Ixodida al que pertenecen las garrapatas, que se diferencian de los demás ácaros en que presentan hipostoma dentado y una estructura quimiorreceptora en el primer par de patas denominada órgano de Haller (Faccioli, 2011). Son ectoparásitos hematófagos obligados de prácticamente todos los vertebrados terrestres (principalmente mamíferos) aves, reptiles y algunos anfibios (Cortez, 2011). Las garrapatas tienen cabeza y tórax fusionados, carecen de antenas y tienen cuatro pares de patas al igual que las arañas y escorpiones, excepto las larvas que en vez de cuatro poseen tres pares de patas (Faccioli, 2011).

Las garrapatas son de vida libre, pero como se menciona previamente, necesitan alimentarse de sangre durante al menos una etapa de la vida. Las garrapatas "blandas" (familia: Argasidae) se fijan al hospedador alimentándose completamente en pocos minutos, ya que se separan rápidamente. Las garrapatas "duras" (familia: Ixodidae) tienen alimentación prolongada, permaneciendo pegada hasta durante varios días antes de llegar a su saciedad (Fritz,

2009). Adicionalmente, es relevante conocer los tamaños característicos de algunas garrapatas en algunas etapas de la vida, ya que esto puede ayudar a identificar el tipo de garrapata. (Figura 14).

El ciclo de vida de las garrapatas incluye cuatro estados: huevo, larva, ninfa y adulto, las garrapatas del género ixodidae solamente presentan una fase de ninfa, mientras las garrapatas argasidae tienen dos o más etapas de ninfa (Cortez, 2011). Después de la eclosión de los huevos, la garrapata debe alimentarse de sangre en cada etapa para sobrevivir, pudiendo durar algunas hasta 3 años de vida para completar su ciclo de vida (Figura 15) ((CDC) Center of Disease Control and prevention, 2015).

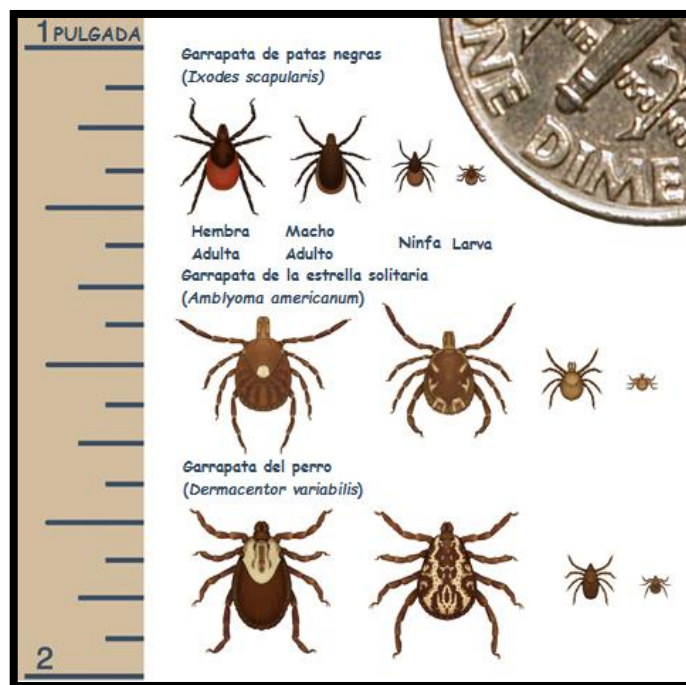


Figura 15. Tamaño relativo de garrapatas según su estado. Modificado de ((CDC) Center of Disease Control and prevention, 2015).

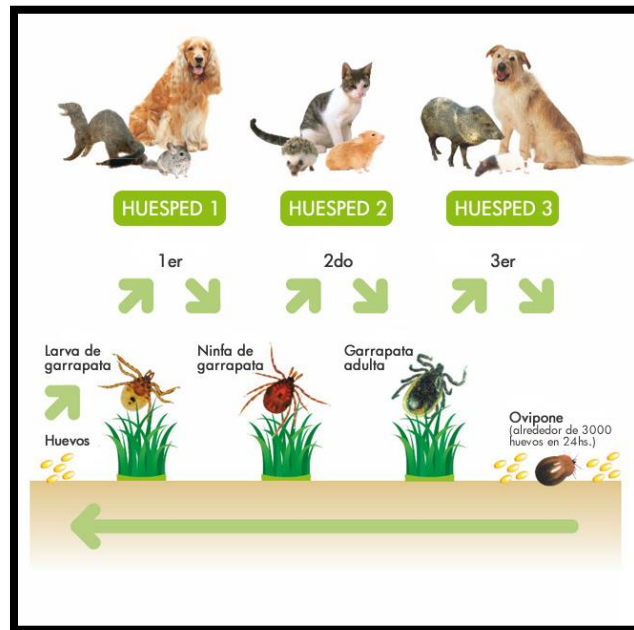


Figura 16. Ciclo de vida de las garrapatas. Tomado de (*Frontline, s.f.*).

Al alimentarse de varios hospedadores, permiten la transmisión de agentes patógenos sanguíneos de un huésped a otro, por lo tanto, el riesgo de transmisión de enfermedades se determina por la prevalencia de garrapatas infectadas (Fritz, 2009), ya que éstas transmiten patógenos a través del proceso de alimentación por medio de la saliva ((CDC) Center of Disease Control and prevention, 2015).

### 3.3. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) Y Serología (técnica de ELISA e Inmunofluorescencia indirecta IFA)

El objetivo de esta técnica, es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN usando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que ésta proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C). Cuando se realiza una reacción de PCR, se simula lo que sucede en una célula al sintetizar el ADN, mezclando lo

necesario para hacerlo en un tubo: la polimerasa, el ADN del organismo que se quiere estudiar (donde se encuentra el fragmento que se quiere sintetizar), los oligonucleótidos (que también se conocen como primers, iniciadores o cebadores) que son necesarios para iniciar la transcripción, dinucleótidos, y unas condiciones especiales para que las enzimas puedan trabajar adecuadamente como lo son: pH, cierta cantidad de magnesio, otras sales y reactivos dependiendo de la polimerasa que se use (Espinosa, 2007).

Las etapas de la PCR son:

- Desnaturalización del ADN (Figura 17).
- Hibridación de los Primers a una zona específica de cada una de las hebras de ADN (Figura 18).
- Extensión del cebador por actuación del ADN polimerasa. (Figura 19) (Cortazar & Silva , 2004).

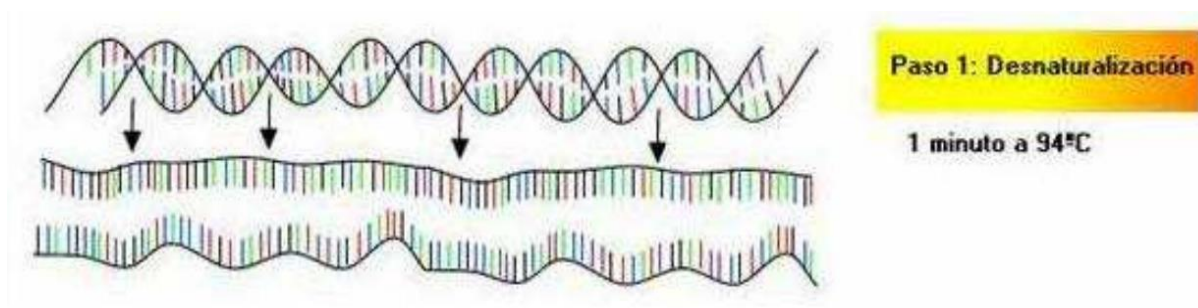


Figura 17. En esta primera etapa la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Esto se hace realizando una incubación de la muestra a altas temperaturas (93°C a 97°C). Tomado de <https://www.frro.utn.edu.ar>.

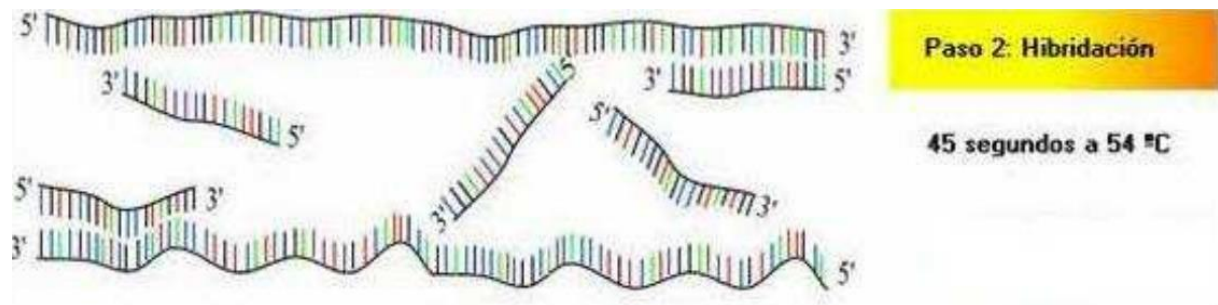


Figura 18. En el segundo paso que es la hibridación, los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Esto se realiza gracias a la bajada de temperatura (50°C a 65°C). Tomado de <https://www.frro.utn.edu.ar>.

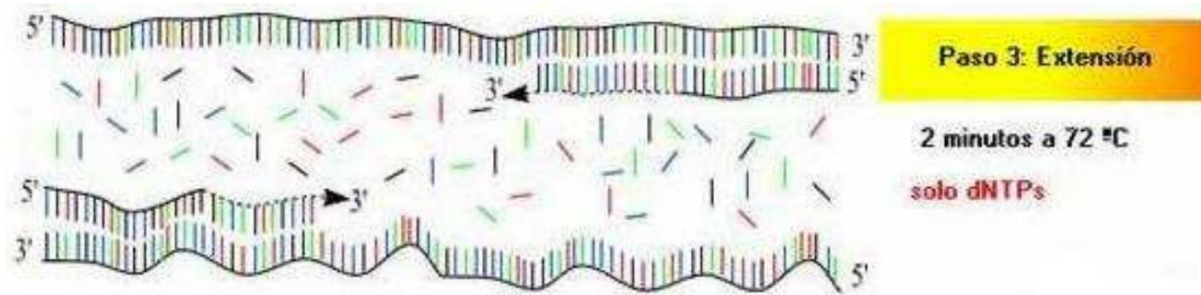


Figura 19. Tercera etapa, Elongación. Se produce la síntesis de una cadena sencilla en la dirección de 5' a 3' mediante la enzima de ADN polimerasa. La cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Tomado de <https://www.frro.utn.edu.ar>.

Como cada región sintetizada sirve como base para sintetizar otras en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará de forma exponencial (Figura 20). Es decir, que con una sola molécula de ADN en el ciclo 1 se producen  $2^1 = 2$  nuevos fragmentos, en el ciclo 2 serán  $2^2$ , esto significa que se sintetizan 4 fragmentos nuevos y así sucesivamente, hasta lograr por ejemplo con 35 ciclos que producirán  $2^1 + 2^2 \dots + 2^{34} + 2^{35} = 2^{36}$ , fragmentos nuevos (Espinosa, 2007).



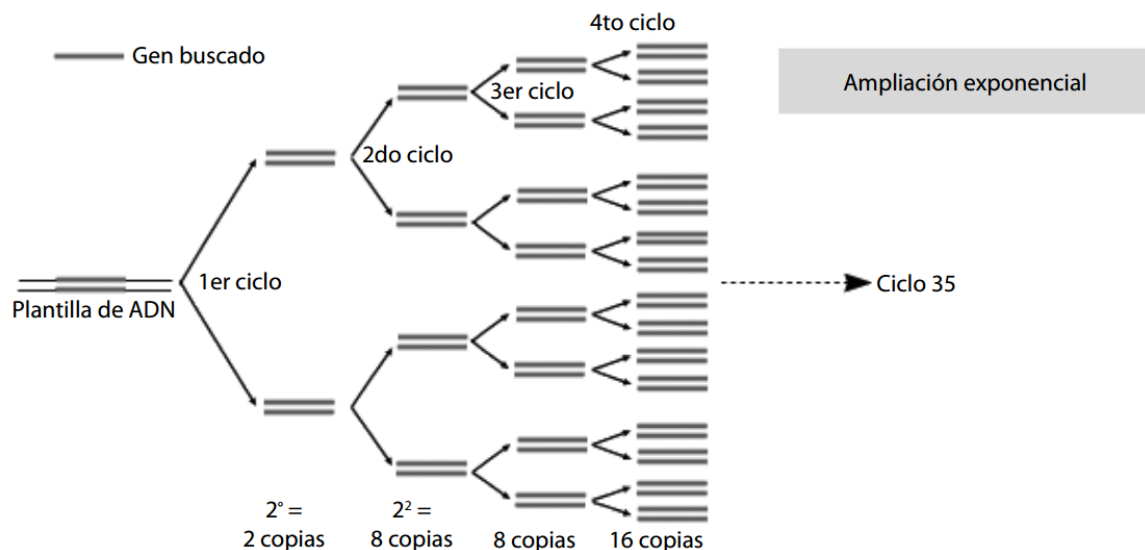


Figura 20. Reacción de PCR en la que los fragmentos se amplifican de forma exponencial. Tomado de (*Espinosa, 2007; Sellon, 2003*).

La prueba de ELISA es un ensayo que permite cuantificar una proteína en una mezcla mediante el uso de un anticuerpo y un antígeno. Su fundamento es la unión de anticuerpo y antígeno, así que un resultado positivo indica que el anticuerpo está presente porque está cumpliendo su función, y por lo tanto el canino ha contraído una enfermedad determinada.

En la *Ehrlichia canis*, los títulos elevados de anticuerpos se pueden observar tras la exposición al agente durante las tres fases de la enfermedad (aguda, subclínica y crónica) incluso luego del tratamiento (Paulino , 2011). Hay una serie de eventos y de períodos óptimos para recoger las muestras para el diagnóstico serológico de enfermedades rickettsiales; por ejemplo, en el inicio, cuando la garrapata se alimenta, hay un “período de gracia” antes de que el patógeno se transfiera al huésped mamífero (Figura 21), que en el caso de estas patologías es de 4 a 48 horas. Luego de la infección hay un período de tiempo variable antes de que aparezcan los signos clínicos, en este momento las pruebas diagnósticas más fiables pueden ser el cultivo bacteriano, la visualización directa de las mórulas, y el análisis molecular (Nicholson, Allen, McQuiston, Breitschwerdt, & Poco, 2010). En cuanto al cultivo bacteriano, se realiza en pocos centros diagnósticos a nivel mundial, ya que es necesario un laboratorio con un nivel mínimo de seguridad

de tipo 3. Siendo la línea celular más adecuada para el cultivo de *A. phagocytophilum* las células promielocíticas leucémicas HL-60 (Anda, y otros, 2007); por lo tanto, esta técnica no es muy común y tampoco es muy práctica para nuestra cotidianidad.

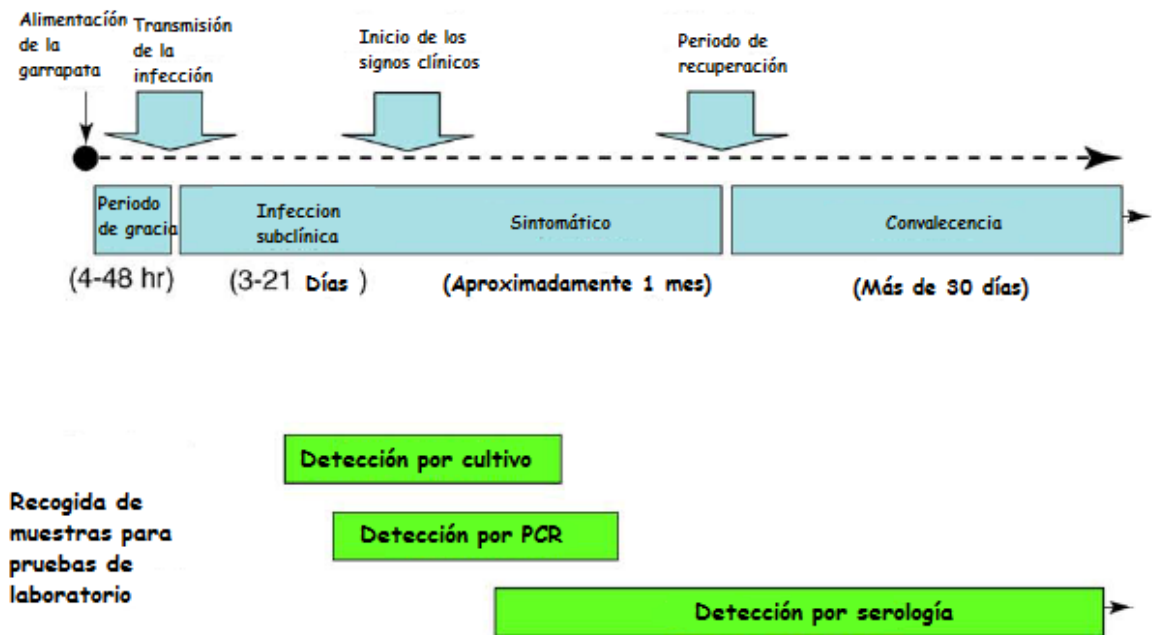


Figura 21. Momento idóneo para utilización de serología en la detección de infecciones rickettsiales. Tomado de (Nicholson, Allen, McQuiston, Breitschwerdt, & Poco, 2010).

La serología es útil en un momento más tardío, cuando ya se han producido los anticuerpos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta prueba, en fases iniciales de la infección aguda y en animales moribundos se pueden encontrar títulos negativos, en el inicio por el reducido tiempo para la producción de una respuesta humoral, y en la etapa final debido a agotamiento de la producción de anticuerpos (Cohn, 2003). La ELISA y la IFA según varios autores, tienen una sensibilidad igual o superior al 71% y una especificidad del 100%, a pesar de esto la sensibilidad de estas pruebas disminuye para títulos de anticuerpos menores de 1:320, pudiendo dar como resultado falsos negativos (Paulino, 2011; Waner, y otros, 2001).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Localización.

Las muestras sanguíneas y los ectoparásitos (garrapatas) fueron recolectadas en dos clínicas veterinarias en los municipios de La Mesa(Cundinamarca) y El Espinal (Tolima). El municipio La Mesa (grupo 1) cuenta con temperaturas de 22°C y una altitud de 1200 msnm y el municipio El Espinal (grupo 2) tiene una temperatura promedio de 25°C y una altitud de 323 msnm.

Para la recolección de muestras, el médico veterinario y el propietario de la mascota accedieron a la toma, evaluación y procesamiento, para el diagnóstico de enfermedades rickettsiales. Las muestras para PCR fueron procesadas en el laboratorio de la Corporación Patología Veterinaria CORPAVET y para prueba de SNAP en el consultorio S.O.S. ANIMAL en Bogotá D.C., teniendo en cuenta los criterios de inclusión.

### 4.2. Población y muestra.

Se seleccionaron 50 caninos de forma aleatoria y por conveniencia que llegaban a consulta veterinaria. En el municipio de Espinal se seleccionaron 23 caninos y en La Mesa 27 caninos; no se discriminó por sexo, edad, raza o localización.

#### 4.2.1. Criterios de selección

Los criterios de selección fueron presentar o haber presentado infestación por garrapatas en algún momento de su vida y manifestar alguno de los siguientes signos:

- Anorexia.
- Temperatura mayor de 38,5°C. Se diferenció entre pirexia e hipertermia, ya que el centro de la termorregulación está situado en el hipotálamo y contiene dos partes, una que interviene en la pérdida de calor que es la región rostral, controlada por el sistema parasimpático; la otra controla la producción de calor, que es la región caudal y está bajo el control simpático. La actividad muscular puede producir rápidamente gran cantidad de calor (Packman, 2016), es por esta razón que dentro del protocolo para realizar la toma de temperatura se dio un lapso de 15 minutos para que los caninos estuvieran en estado de reposo. La hipertermia deriva de un aumento de actividad muscular, un aumento de la temperatura ambiental o un aumento de la tasa metabólica (Packman, 2016).
- Linfadenomegalia.
- Descarga oculonasal.
- Uveítis.
- Signos de sistema nervioso central.
- Baja condición corporal.
- Depresión.
- Esplenomegalia.
- Epistaxis.
- Equimosis en piel y/o membranas mucosas.

#### 4.2.1. Toma de muestras

A los caninos incluidos en el estudio se les realizó cuadro hemático y prueba de inmunocromatografía rápida (prueba SNAP) que detecta anticuerpos de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* y antígeno de *Dirofilaria immitis*. La prueba realizada se conoce con

nombre comercial SNAP® 4Dx® Plus de IDEXX, se incluyeron caninos con resultados de SNAP tanto positivo como negativo y se realizó una encuesta para la reseña del animal e identificación de signos clínicos compatibles con estas infecciones, además de un permiso consentido (Anexo A y B).

Se colectaron 3 a 5ml de sangre en tubos con EDTA (tapa lila) y se almacenaron en refrigeración a 5°C hasta su procesamiento en un lapso no superior a 24 h. Se realizó cuadro hemático, extendido sanguíneo pruebas PCR y SNAP. Adicionalmente se recolectaron de 3 a 5 garrapatas a 25 caninos seleccionados aleatoriamente y por conveniencia, 13 en el grupo 1 y 12 del grupo 2 y remitidas en recipientes plásticos de cierre hermético, estéril, identificadas con los datos del canino del cual se extrajeron (Figura 22).



Figura 22. Recolección de garrapatas.

### **4.3. Análisis de laboratorio.**

Las 50 muestras de sangre sometidas a los análisis se obtuvieron de la vena cefálica de caninos en tubos de 5 ml con anticoagulante EDTA, con un volumen de muestra mayor o igual a 3 ml. Todas las muestras fueron recogidas con un tiempo de espera mínimo de 15 minutos, para confirmar que los caninos se encontrasen en estado de reposo; las muestras fueron analizadas dentro de las siguientes 24 horas de haberlas obtenido.

#### **4.3.1. Hematología**

A partir de esta muestra se realizó centrifugación durante 5 minutos a 12000 rpm en capilares de micro hematocrito con EDTA; posteriormente se realizaron las extensiones y se tiñeron con Giemsa y con Diff Quick. Luego se realizó análisis con microscopía óptica de luz blanca en busca de organismos rickettsiales. Las muestras fueron evaluadas por tres profesionales independientes con experiencia en diagnóstico de estas enfermedades.

#### **4.3.2. Hemogramas**

Para asegurar el buen procesamiento de las muestras se realizó la totalidad de los hemogramas en el laboratorio Diagnovet, en la ciudad de Bogotá. Las muestras se procesaron con dos equipos para los hemogramas MINDRAY BC 2800 VET, Vetscan HMII ABAXIS y las proteínas en el URIT-8021A.

### 4.3.3. Prueba SNAP

Las pruebas de SNAP se corrieron también en Bogotá para asegurar que todas fueran realizadas con el mismo kit comercial. Se realizaron en las instalaciones del consultorio veterinario S.O.S. ANIMAL, con el kit comercial 4Dx plus de Idexx (Kit para la detección de Antígeno de *Dirofilaria immitis* -Anticuerpos frente a *Anaplasma phagocytophilum*/*Anaplasma platys*-*Borrelia burgdorferi*-*Ehrlichia canis*/*Ehrlichia ewingii*). El procedimiento se realizó según lo estipula el inserto adjunto en el anexo C.

### 4.3.4. PCR

Para la obtención del genoma de los organismos de interés, se utilizó un kit comercial Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit #K0721, #K0722, con el que se procesaron las muestras de sangre y se realizó el protocolo de extracción de ADN de bacterias Gram negativas (Anexo D).

Luego de la extracción de ADN se realizó la prueba de PCR convencional, mediante el uso de cebadores específicos de la especie, esta prueba se desarrolló con el kit comercial Accupower® Rickettsiales 3-Plex PCR, que incluye *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* (Figura 24).

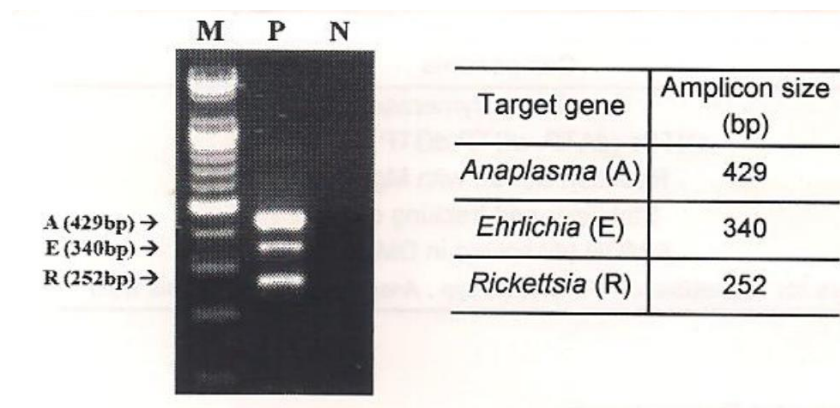


Figura 23. Tamaño de ampliación en cada microorganismo. Tomado de kit comercial Accupower® Rickettsiales 3-Plex PCR.

El procedimiento a seguir con las garrapatas se desarrolló con base en el método del doctor Pedro Fernández Soto (2003), tesis doctoral (Anexo E). Se realizaron los dos procedimientos anteriormente descritos (extracción de ADN y prueba de PCR para Rickettsias con el mismo kit).

#### **4.4. Diseño estadístico.**

Los datos obtenidos se organizaron en tablas como se muestra en los Anexos F y G; se analizaron con las siguientes pruebas estadísticas:

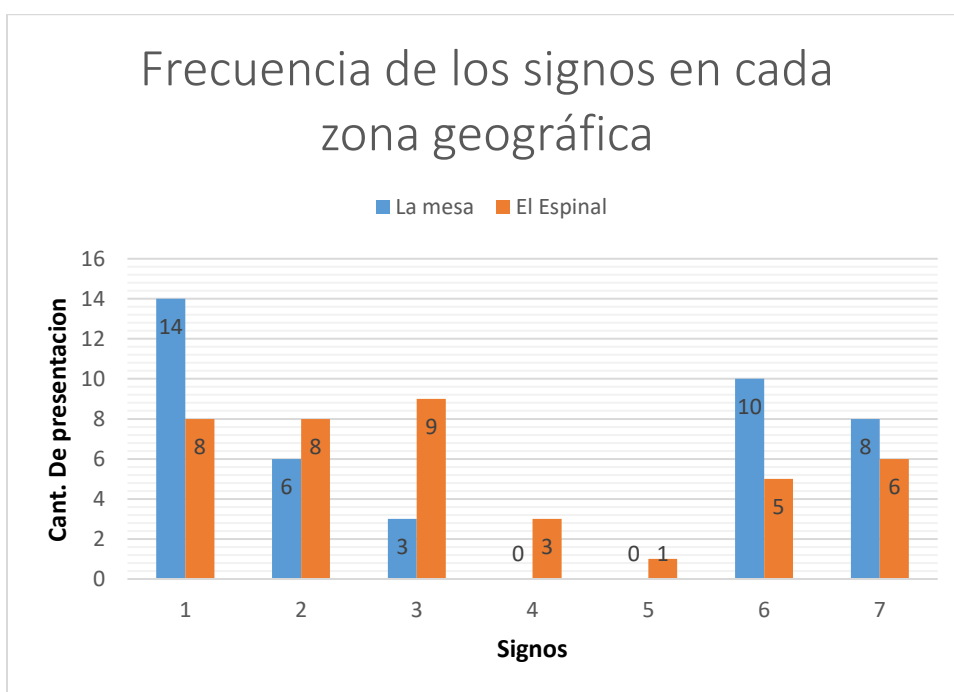
- Análisis de frecuencia para evaluar el comportamiento de las muestras estudiadas y signos clínicos de los caninos.
- Análisis descriptivo usando media, mediana y desviación estándar.
- ANOVA para las variables del hemograma y del hemograma vs. SNAP, para medir la diferencia de cada variable del hemograma, de acuerdo con la prueba detectora de anticuerpos siendo esta variable categórica (+/-).
- Análisis descriptivo de hemograma.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Observación clínica y Anamnesis.

Los caninos estudiados presentaban signos clínicos y anamnesis compatibles con infecciones rickettsiales, incluyendo *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Rickettsia* spp., como lo son (fiebre, linfadenomegalia, anorexia, decaimiento entre otros y haber tenido garrapatas alguna vez en su vida). La gráfica 1, y Tabla relacionada en anexo G, evidencian los signos clínicos más relevantes identificados en el estudio.

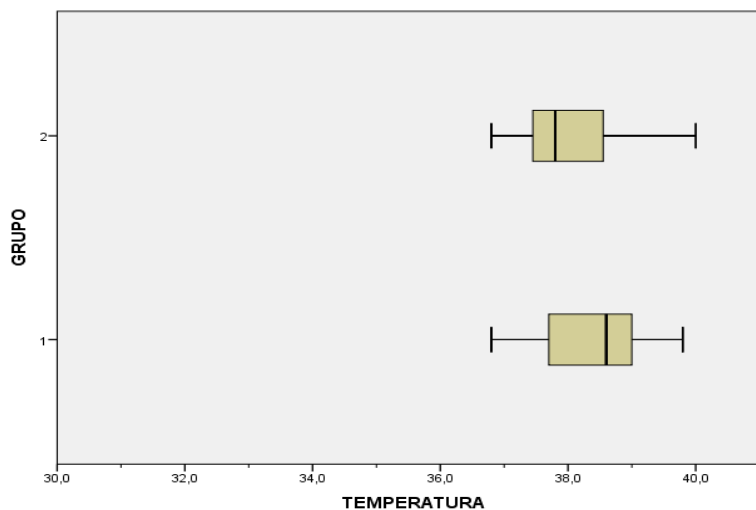


Gráfica 1. Presentación de los signos según cada zona geográfica. 1) Temperatura  $>38,5^{\circ}\text{C}$ , 2) Anorexia, 3) Linfadenomegalia, 4) Descarga oculonasal, 5) Signos de SNC, 6) Baja condición corporal, 7) Decaimiento

### 5.1.1. Valoración de temperatura

En el momento de recolección de muestras sanguíneas, 22 (40%) de los caninos estudiados presentaron temperaturas mayores a la temperatura normal en caninos ( $38,5^{\circ}\text{C}$ ). Algunos no presentaron signos de fiebre, como aumento de frecuencia cardíaca, aumento de frecuencia respiratoria y/o temblores, y fueron considerados con hipertermia.

En el grupo 1, 14 (60,8%) animales presentaron temperatura superior a  $38,5^{\circ}\text{C}$  y solo uno de ellos no presentaba los signos de fiebre mencionados anteriormente. En el grupo 2, 8 (29,6%) caninos presentaron temperatura mayor a  $38,5^{\circ}\text{C}$  y solo uno de estos no tenía signos asociados a fiebre. En la siguiente gráfica se puede observar el comportamiento de la temperatura en los dos grupos estudiados.



Gráfica 2. Medición de la temperatura en (grados Centígrados  $^{\circ}\text{C}$ ) de los grupos 1 y 2. El Grupo 1 presenta mayor variación de temperatura, y mayor valor de la mediana donde la mediana del grupo 1 es 38,6, y la del grupo 2 es 37,8.

### **5.1.2. Valoración de la condición corporal**

La valoración de la condición corporal fue realizada según los datos proporcionados por los médicos veterinarios. Se evaluó basándose en una escala de 5 niveles (WSAVA, 2014), siendo 3/5 lo ideal para los caninos. La condición corporal se determinó según el aspecto visual, por ejemplo, si había o no cintura y con la palpación de la cantidad de grasa sobre las costillas, la evaluación del puntaje se basa en la palpación del músculo esquelético sobre el cráneo, las escápulas, la columna vertebral y la pelvis, así como lo indica la guía de puntuación de condición muscular del Comité de Nutrición Global del WSAVA (Anexo H).

15 (30%) de los caninos estudiados, presentaron baja condición corporal, 10 del Grupo 1 (43,5%) y 5 (18,5%) del Grupo 2.

### **5.1.3. Anorexia y decaimiento**

El 25,4% (14 perros) presentaron anorexia; 6 (26%) del Grupo 1 y 8 (29,6%) del Grupo 2. Otro signo relevante fue el decaimiento, el cual se presentó en el 25,4% de los animales evaluados, 8 caninos (34,7%) del Grupo 1 y 6 (22,2%) del Grupo 2.

### **5.1.4. Linfadenomegalia y otros signos**

Los nódulos linfáticos tomados como base para el examen clínico fueron los palpables (mandibulares, poplíteos e inguinales). Se consideraron con linfadenomegalia los caninos que presentaron en el examen clínico un aumento de tamaño visible o palpable de los nódulos linfáticos, con presencia de dolor, con o sin alteración de la consistencia. Con este signo se encontraron 12 (24%) caninos. Otros signos con menor porcentaje como la descarga oculonasal

y cuadro neurológico (Figura 25), están representados con 3 (6%) y 1 (2%) respectivamente, presentándose solo en el Grupo 2.



Figura 24. Canino No. 35 del estudio con signos de SNC y poliartritis.

## 5.2. Resultados del hemograma

En Tabla (mimis, coloca el nombre de la Tabla) del Anexo H, se muestra el análisis de varianza realizado en cada uno de los componentes del hemograma. Los resultados revelan diferencias significativas en las globulinas, en el ancho de distribución de eritrocitos RDW, en los monocitos y en los eosinófilos ( $p \leq 0.05$ ), con una confianza del 95%. En el caso de los leucocitos, eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen globular medio VGM, hemoglobina corpuscular media HCM, concentración de hemoglobina corpuscular media CGMH, plaquetas, proteínas, albúmina, neutrófilos y linfocitos tienen un valor ( $p \geq 0.05$ ), con esto se puede inferir estadísticamente con un nivel de confianza de 95% que no hay diferencia significativa.

### 5.2.1. Análisis descriptivos para las variables de hemograma vs SNAP

Se realizaron análisis descriptivos para las variables del hemograma, clasificando los caninos en tres grupos según los resultados de SNAP, donde el Grupo 1 comprende los caninos positivos únicamente a *Ehrlichia* spp, el Grupo 2 caninos positivos a *Ehrlichia* spp y *Anaplasma*

spp y el Grupo 3 los caninos negativos a todos. Los eritrocitos y hemoglobina del Grupo 1 están ligeramente por debajo del rango normal, tomando los valores de referencia del laboratorio donde se procesaron las muestras; adicionalmente, la media de los eosinófilos en los caninos negativos muestra que el promedio de éstos está ligeramente aumentado, ver Tabla (*Análisis descriptivos de las variables de hemograma*) en el Anexo I.

### 5.2.2. Diferencia de cada variable del hemograma de acuerdo al resultado de la prueba SNAP.

Se estableció una correlación entre los resultados de la prueba de SNAP y los resultados de los cuadros hemáticos. Los resultados de pruebas SNAP se diferenciaron en dos grupos, el primero con los caninos positivos a uno o varios agentes patógenos y el segundo con los caninos negativos. Es así como se encontraron diferencias significativas, para los monocitos y eosinófilos, no obstante, los rangos normales para caninos  $0,15 - 1,7 * 10^9$  y  $0 - 0,9 * 10^9$  respectivamente (Meyer & Harvey, 2000), siendo el valor  $P = 0.039$  para la variable monocitos. Esto nos permite afirmar que existe una diferencia para esta variable al cambiar el resultado en la prueba positivo o negativo al SNAP, observando el Anexo J, sé evidencia que:

Para a individuos con SNAP positivo a *Ehrlichia spp* o a *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp*, el promedio del conteo de monocitos es 0.5, mientras que para SNAP negativo es 0.8. Esta diferencia en la media para las dos posibilidades de SNAP se considera estadísticamente significativa y permite afirmar que existe una diferencia para los dos grupos SNAP. Para este análisis se afirma que existen diferencias solo en los dos casos resaltados en la tabla abajo (Tabla 2).

Tabla de ANOVA<sup>a</sup>

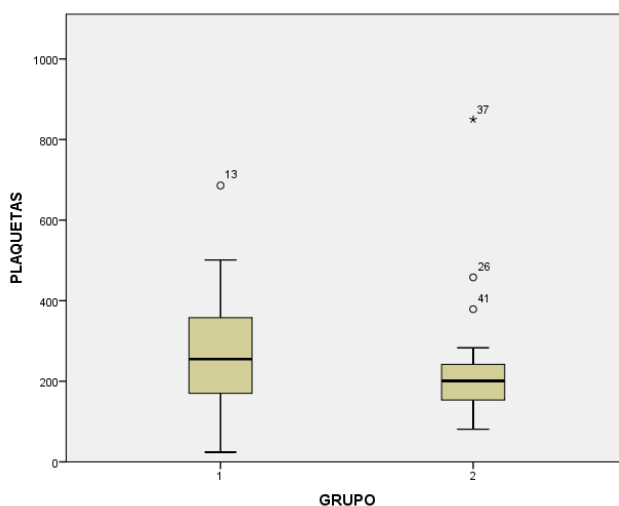
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LEUCOCITOS * SNAP	Inter-grupos	1,0	1	1,0	,032	,859
	Intra-grupos	1580,3	48	32,9		
	Total	1581,3	49			
ERITROCITOS * SNAP	Inter-grupos	0,1	1	0,1	,052	,821
	Intra-grupos	122,8	48	2,6		
	Total	122,9	49			
HEMOGLOBINA * SNAP	Inter-grupos	133,9	1	133,9	,092	,762
	Intra-grupos	69548,6	48	1448,9		
	Total	69682,5	49			
HEMATOCRITO * SNAP	Inter-grupos	0,0	1	0,0	,117	,734
	Intra-grupos	0,6	48	0,0		
	Total	0,6	49			
VGM * SNAP	Inter-grupos	28,8	1	28,8	1,477	,230
	Intra-grupos	937,1	48	19,5		
	Total	965,9	49			
HCM * SNAP	Inter-grupos	1,5	1	1,5	,384	,538
	Intra-grupos	190,5	48	4,0		
	Total	192,0	49			
CGMH * SNAP	Inter-grupos	68,9	1	68,9	,176	,677
	Intra-grupos	18797,5	48	391,6		
	Total	18866,4	49			
RDW * SNAP	Inter-grupos	1,8	1	1,8	1,148	,289
	Intra-grupos	73,6	48	1,5		
	Total	75,4	49			
PLAQUETAS * SNAP	Inter-grupos	6537,5	1	6537,5	,293	,591
	Intra-grupos	1070014,5	48	22292,0		
	Total	1076552,0	49			
PROTEINAS * SNAP	Inter-grupos	162,4	1	162,4	3,848	,056
	Intra-grupos	2026,5	48	42,2		
	Total	2189,0	49			
ALBUMINA * SNAP	Inter-grupos	0,0	1	0,0	,001	,970
	Intra-grupos	1550,5	48	32,3		
	Total	1550,6	49			
GLOBULINAS * SNAP	Inter-grupos	168,0	1	168,0	2,142	,150
	Intra-grupos	3764,0	48	78,4		
	Total	3932,0	49			
NEUTROFILOS * SNAP	Inter-grupos	0,0	1	0,0	,003	,960
	Intra-grupos	829,3	48	17,3		
	Total	829,3	49			
LINFOCITOS * SNAP	Inter-grupos	2,7	1	2,7	,553	,461
	Intra-grupos	235,9	48	4,9		
	Total	238,7	49			
MONOCITOS * SNAP	Inter-grupos	0,9	1	0,9	4,513	,039
	Intra-grupos	9,9	48	0,2		
	Total	10,9	49			
EOSINOFILOS * SNAP	Inter-grupos	3,0	1	3,0	15,113	,000
	Intra-grupos	9,4	47	0,2		
	Total	12,4	48			

Tabla 1. Valores de P con un valor de confianza del 95%, en el ANOVA realizado a las variables del hemograma, analizando los resultados por grupos, uno donde el resultado de

SNAP fue positivo a *Ehrlichia* spp o a *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp y otro donde fue negativo.

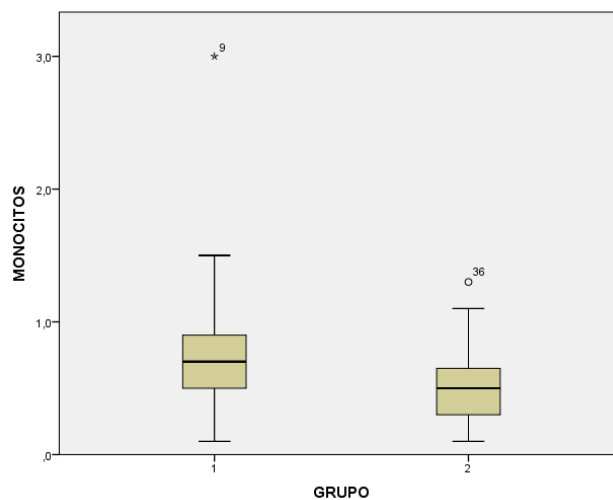
### 5.2.3. Comparación de los resultados en el hemograma por zona geográfica.

En cuanto a las plaquetas, 16 (32%) de los caninos en estudio mostraron trombocitopenia (valores por debajo de  $200 \times 10^9/L$ ). La gráfica 4 muestra que los valores en el Grupo 1 están más dispersos que los del Grupo 2, indicando así, que este último tiene mayor estabilidad, y los datos son más predecibles en este grupo. Estadísticamente se puede decir que no hay diferencia significativa, con un nivel de confianza de 95%, ya que ( $p \geq 0.05$ ).



Gráfica 3. Medición de las plaquetas en los Grupos 1 y 2. Se observa que el Grupo 2 mostró una menor variación.

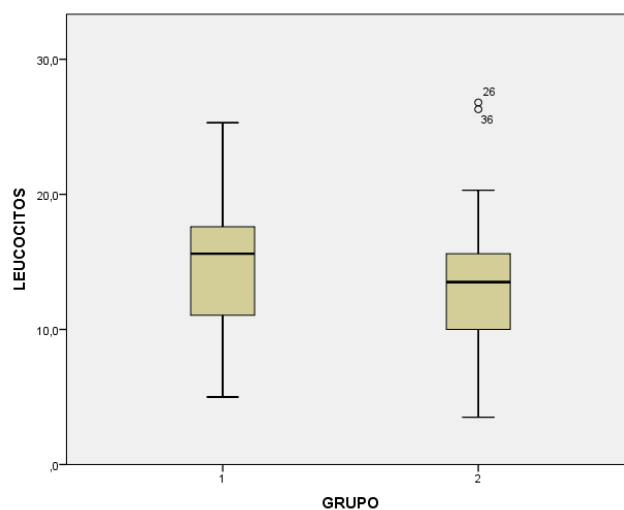
Los resultados de los monocitos revelan que hay una diferencia significativa entre las dos zonas geográficas con un ( $p \leq 0.05$ ) y la gráfica 5 muestra que en el Grupo 1 la mediana es mayor a la del grupo 2. Se debe tener en cuenta que los monocitos son células blanco de *Ehrlichia canis*.



Gráfica 4. Se aprecia la medición de los Monocitos de un grupo con respecto al otro. Donde el Grupo 1 muestra una mediana mayor a la del Grupo 2, y muestra mayor dispersión de los resultados.

Por otra parte, los resultados de los leucocitos tuvieron mucha variación de datos. Dentro de los dos grupos, como se puede observar en la gráfica 6, existe una dispersión de datos, que indica que la medida no es tan predecible en ninguno de los dos. Esto quiere decir, que no se pueden predecir los resultados de ninguno de los dos grupos. Adicionalmente la mediana del Grupo 1 es evidentemente mayor que la del Grupo 2. 4 (8%) caninos presentaron resultados por debajo del límite inferior dentro del rango normal ( $6-14,6 * 10^9/L$ ) y 23 (46%) tenían el recuento de leucocitos por encima del rango superior normal.

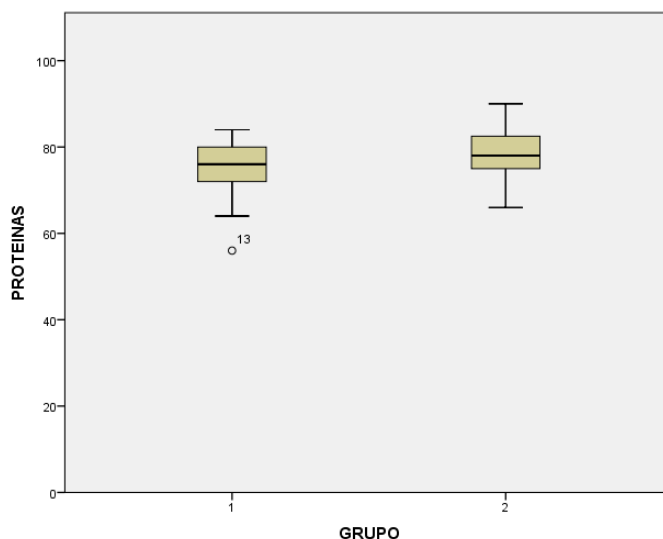




Gráfica 5. Medición de recuento leucocitario, donde se evidencia que el conteo de leucocitos es mayor en el Grupo 1 y a su vez este grupo tiene mayor varianza que el Grupo 2.

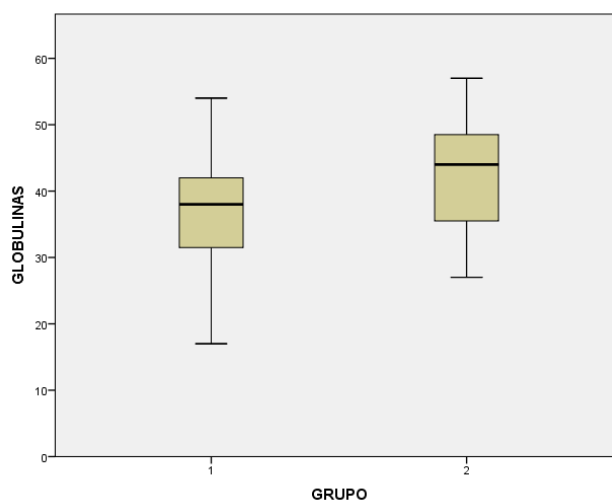
#### 5.2.4. Bioquímica clínica

A continuación, se exponen los hallazgos de los resultados de las proteínas plasmáticas totales. Los valores de referencia para caninos adultos, según el laboratorio que realizó los hemogramas, son de 60-78 g/L. Las medianas de los dos grupos de caninos evaluados (Grupo 1 caninos La Mesa, Grupo 2, caninos El Espinal), se encontraron cercanas al límite superior (Gráfica 6).



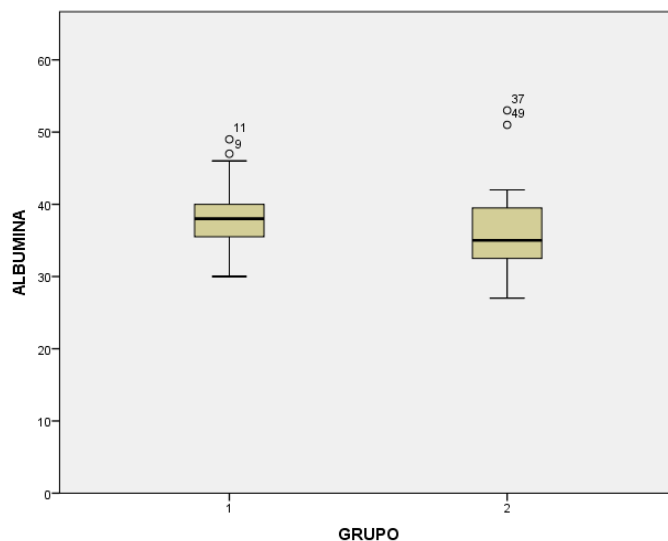
Gráfica 6. Se puede observar que los resultados más altos en los dos grupos exceden el límite superior de los valores de referencia de las proteínas en caninos adultos (60 a 78g/l).

La Gráfica 7 muestra que la mediana de las globulinas del Grupo 2 es más alta que la del Grupo 1 y se encuentra por encima del límite superior 24 – 40 g/L, siendo su valor 44.



Gráfica 7. Medición de las globulinas en g/L de los Grupos 1 (La Mesa) y 2 (El Espinal). El Grupo 2 mostró una mayor variación de la globulina.

Por último, se muestra el comportamiento de los resultados de la albúmina, donde se puede observar que los datos están más dispersos en el Grupo 2, y esto quiere decir que no es una variable predictiva.



Gráfica 8. Se puede observar el comportamiento de los resultados de albúmina.

### 5.3. Resultados de la evaluación del extendido sanguíneo.

Los extendidos fueron analizados por tres evaluadores independientes usando la tinción de Diff-Quick y Giemsa, bajo los protocolos adjuntos en el Anexo K; ninguno de los tres observó la presencia de microorganismos compatibles con *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Rickettsia rickettsii*.

### 5.4. Resultados de prueba SNAP

Los resultados obtenidos de los casos estudiados, mediante la prueba de SNAP (Tabla 3), muestran que 26 (52%) de los caninos fueron positivos a la presencia de anticuerpos para *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii*, 9 caninos (18%) fueron positivos a la exposición a más de un agente etiológico, en este caso a *Ehrlichia canis*/*E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum*/*A. platys* de forma conjunta y 15 (30%) de los caninos fueron negativos a la detección de anticuerpos para *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp y *Borrelia*, así como de antígenos de *Dirofilaria immitis*.

Ninguno de los animales estudiados tuvo resultados positivos solo a *Anaplasma phagocytophilum* y *A. platys*.

AGENTE INFECCIOSO	PRUEBA DIAGNÓSTICA	
	PRUEBA SNAP	
	CANINOS	POSITIVOS
<i>E. canis/ E. ewingii</i>	26	52%
<i>A. platys/ A. phagocytophilum</i>	0	0%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0	0%
<i>E. canis/ E. ewingii en conjunta con A. platys/ A. phagocytophilum</i>	9	18%
<i>Caninos negativos</i>	15	30%

Tabla 2. Resultados de la prueba de SNAP según cada agente infeccioso evaluado por esta prueba.

### 5.5. Resultados de la detección de antígeno por PCR

Las 50 muestras de sangre fueron negativas a la prueba de PCR para la identificación de material genómico de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Rickettsia rickettsii*, así como los resultados de PCR realizados en las garrapatas recolectadas. (Anexo N).

### 5.6. Resultados de pruebas y su asociación (SNAP, PCR Y FROTIS)

En las pruebas de PCR y extendido sanguíneo, no se detectó el genoma ni la presencia de microorganismos en estudio, no obstante, la sensibilidad de dichas pruebas. Por tal motivo no tienen ninguna relación estadística con los resultados arrojados por la prueba de SNAP, ya que en estos se evidenció la presencia de anticuerpos contra estas bacterias. A continuación, se muestra en detalle los resultados de las pruebas en mención.

AGENTE INFECTADO	PRUEBAS DIAGNÓSTICAS					
	SNAP		PCR		EXTENDIDO	
	PACIENTES	POSITIVOS	PACIENTES	POSITIVOS	PACIENTES	POSITIVOS
<i>E. canis/ E. ewingii</i>	26	52%	0	0	0	0
<i>A. platys/ A. phagocytophilum</i>	0	0%	0	0	0	0
<i>Dirofilaria immitis</i>						
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0	0%	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>E. canis/ E. ewingii</i> conjunta con <i>A. platys/ A. phagocytophilum</i>	9	18%	0	0	0	0
<i>Rickettsia rickettsii</i>	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)
<i>Pacientes negativos</i>	15	30%	50	100%	50	100%

Tabla 3. Se puede observar los resultados de las pruebas realizadas en los caninos estudiados.

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal, establecer el estadio de infecciones rickettsiales en caninos, evaluados mediante la utilización de tres métodos diagnósticos en simultáneo (SNAP, PCR y frotis sanguíneo), con el fin de poner a prueba las diferentes herramientas con las que se cuenta en la clínica diaria. Estos resultados se correlacionaron con los resultados de cuadro hemático y signos clínicos encontrados en los caninos en estudio; dando lugar a una crítica preliminar de los métodos diagnósticos más usados por los médicos veterinarios y algunas recomendaciones al respecto.

Durante la toma de muestras fue evidente la presencia de ectoparásitos, tanto de pulgas como de garrapatas (*Amblyoma* y *Rhipicephalus*,) las cuales fueron colectadas y enviadas para análisis molecular de PCR. No se identificó la presencia de agentes rickettsiales en los pellets de muestras de las garrapatas de los 25 animales muestreados. No obstante, que Huerto & Dámaso (2015) en el Perú, reportó que, en una zona geográfica con condiciones de altura y temperatura similares a una de las zonas muestreadas, encontró asociación entre la presencia de garrapatas y la presentación tanto de cuadro clínico como de anticuerpos contra Ehrlichiosis. En el caso de esta investigación no se presentó el genoma de los antígenos en estudio en PCR y extendido sanguíneo.

Evaluando los signos clínicos compatibles con cuadros de infecciones rickettsiales se encontró que los de mayor presentación fueron el aumento de temperatura, seguido de baja condición corporal, decaimiento y anorexia; algunos de los caninos presentaron signos como sangrado en las encías (caninos número 22, 44 y 48), poliartritis (canino 35) y hematoquecia (canino 28). Se debe considerar que no solo las enfermedades de los agentes rickettsiales pueden generar este tipo de cuadros clínicos, sino también, otros tipos de enfermedades de tipo infeccioso, inmunitario

(como el lupus eritematoso sistémico, trombocitopenias inmunomediadas), trastornos vasculares, intoxicaciones con anticoagulantes. Es por esto que, el clínico debe tener en cuenta los diagnósticos diferenciales frente a un cuadro rickettsial.

De los caninos con temperatura alta y resultados positivos a pruebas serológicas de anticuerpos, 7 (31%), tuvieron anemias de las cuales, 3 fueron normocíticas hipocrómicas, con presentación de reticulocitos, demostrando así pérdida de sangre crónica posiblemente asociado a estados parasitarios por endoparásitos o ectoparásitos. mostrando actividad regenerativa según lo señala (Villiers, 2013); lo cual, se puede observar dentro de los hallazgos de hemogramas de caninos con presencia de hemoparásitos y enfermedades rickettsiales. Uno de estos tres caninos con anemias normocíticas hipocrómicas (número 12), tenía proteínas plasmáticas altas debido a hiperglobulinemia; 24 caninos más la presentaban (en total 25 caninos con hiperglobulinemia), lo cual, se puede hallar en enfermedades infecciosas como las causadas por el orden Rickettsia, así como en otras enfermedades inflamatorias e infecciosas, como los piodermas, en las que se presentan alta cantidad de antígenos a los linfocitos B, y en estados parasitarios crónicos. También se presentan en algunos tipos de neoplasias, procesos leucémicos, enfermedades inmunomediadas como el lupus eritematoso sistémico o en poliartritis inmunomediadas, gastroenterocolitis plasmocitaria, procesos con gran destrucción de tejido, entre otras (Villiers, 2013; Font, Cloas, & Mascort, 1994). De estos 25 caninos, a 12 (48%) se les encontró anticuerpos contra *E. canis/E. ewingii* y 6 (24%) presentaron anticuerpos contra *E. canis/E. ewingii* y *A. phagocytophilum/A. platys*. El canino número 44 que además presentaba una trombocitopenia y neutropenia marcadas, una temperatura rectal alta, linfadenomegalia de nódulos linfáticos mandibulares y poplíteos, descarga oculonasal, sangrado de la encía al presionarla y presencia de garrapatas, presenta un cuadro clínico sugerente de hemoparásitos o enfermedades rickettsiales; con este tipo de características clínicas deben tenerse en cuenta diagnósticos diferenciales a las infecciones causadas por el orden de las rickettsias así como se describe en varios estudios (Almazán, y otros, 2015; Bottari, y otros, 2016; Dolz, y otros, 2013); a pesar de la historia y signos de este individuo, no se detectó el genoma de los agentes en estudio, ni en el extendido sanguíneo se encontraron formas evolutivas de hemoparásitos.

En cuanto a la baja condición corporal, se encontró en 15 caninos (30%) de los 50 evaluados. En el grupo 1 (La Mesa, Cundinamarca) se presentó la mayoría, 10 caninos (66%) y de estos 6 (60%) (caninos número 13, 14, 17, 18, 20 y 23) presentaron garrapatas en el momento de la consulta y toma de muestras. En el Grupo 2 (El Espinal, Tolima) solo se encontró baja condición corporal en 5 caninos (33%). De los 10 animales con baja condición corporal ubicados en el Grupo 1, en 7 (70%) se evidenciaron resultados positivos a la exposición a *E. canis/E. ewingii* y 2 (20%) se encontraron positivos a la exposición a *E. canis/E. ewingii* y a *A. phagocytophilum/A. platys.*; adicionalmente, de estos solo un canino presentó hipoproteïnemia.

En los resultados de los hemogramas realizados a la totalidad de caninos muestreados, se encontró que 20 de éstos (40%) presentaron un conteo de eritrocitos igual o por debajo del límite inferior ( $5,5 \times 10^{12}$ ), tomando este dato como base; 9 (45% de los animales con anemia) eran positivos con la prueba de SNAP solo a *Ehrlichia* spp, 5 (25% de los animales con anemia) fueron positivos tanto a *Ehrlichia* spp como a *Anaplasma* spp. Se puede afirmar que de la población total de animales positivos tanto a *Ehrlichia* como a *Anaplasma*, la mayoría, (55%) tuvo un recuento de eritrocitos bajo lo cual implica un cuadro de anemia. No obstante, los hallazgos de anemia en estos animales y teniendo presente que se detectó la presencia de anticuerpos contra agentes rickettsiales, no siempre se puede relacionar un cuadro de anemia con la presentación de estas enfermedades, ya que se debe considerar un diagnóstico integral desde el punto de vista clínico teniendo en cuenta el cuadro clínico, y la utilización de pruebas en serie para confirmar la infección.

Por otro lado, con los animales que presentaron anemia en el cuadro hemático y fueron negativos a la prueba serológica de anticuerpos, a la prueba de PCR y a la evaluación citológica de extendido sanguíneo, se pueden relacionar con otras condiciones infecciosas o no infecciosas, condiciones nutricionales o la presencia de ectoparásitos (tanto pulgas como garrapatas), o endoparásitos, trastornos de coagulación, entre otras.



En los reportes de los hemogramas se puede evidenciar que solo 4 caninos (12, 14, 40 y 48) presentaron un conteo de leucocitos por debajo de lo normal, donde el resultado más bajo fue de  $3,5 * 10^9/L$  mostrando leucopenia. De estos, uno fue positivo a *E. canis/E. ewingii*, (canino 12), otro (canino 40) fue positivo a *E. canis/E. ewingii* y *A. phagocytophilum/A. platys* y los dos restantes (caninos 14 y 48) fueron negativos a todo por la prueba de SNAP. La leucopenia puede estar relacionada con otra condición clínica de los caninos, como infecciones bacterianas agudas (debido a una sobredemanda de leucocitos), parvovirus, diabetes mellitus, entre otras causas.

Los Monocitos fueron las células de línea blanca más afectadas en este estudio estadísticamente, lo que puede ser causado por la exposición anterior a *Ehrlichia canis* ya que ésta, se caracteriza por tener tropismo por células monocíticas como los monocitos.

En total 11 caninos presentaron Eosinofilia causada posiblemente por una carga elevada de parásitos ya sea endo y/o ectoparásitos.

Se evidenció la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia* o/y *Anaplasma*, no obstante, no se puede hacer una relación entre la presentación de fiebre en los caninos estudiados y la aparición de anticuerpos contra estos microorganismos, debido, a que los anticuerpos están apareciendo de forma tardía en la infección. Según Rikihisa y otros en 1992, en la mayoría de los casos de ehrlichiosis los anticuerpos no se desarrollan sino hasta la segunda o tercera semana postinfección. Esto quiere decir que un animal que tenga resultados positivos a presentación de anticuerpos, no necesariamente debe cursar con un cuadro agudo de la enfermedad, ya que la producción máxima de anticuerpos se alcanza al mes de la fase de ehrlichemia y persiste durante largos períodos de tiempo (Harrus, Aroch, Lavy, & Bark, 1997).

No se encontraron estructuras compatibles con los microorganismos estudiados en ninguna de las láminas, no obstante, que tres profesionales distintos hicieron la evaluación de los extendidos. En general, este método diagnóstico es más variable en cuanto a resultado, ya que depende de varios factores, como son: la etapa o fase infectiva del animal, ya que se hace más efectiva su observación en la fase aguda; la experiencia del clínico, y tipo de tinción (Mylonakis,

y otros, 2003) (en esta investigación se realizó Giemsa y Wright). Mylonakis y otros en el 2003, realizaron la evaluación de la citología como diagnóstico de ehrlichiosis monocítica aguda (*Ehrlichia canis*), comparando cinco métodos (capa leucocitaria, sangre periférica, nódulos linfáticos, cultivo a corto plazo) donde se concluye que el uso de la capa leucocitaria y de muestra tomada de nódulos linfáticos, puede conducir a un diagnóstico definitivo de ehrlichiosis monocítica canina.

No se evidenció infección aguda según los resultados de PCR y extendido sanguíneo en los caninos muestreados, no obstante, a la presencia del vector y los criterios de inclusión. Esto puede ser debido al cambio climático, ya que las muestras fueron obtenidas en la temporada de lluvias. Según el IDEAM, son dos temporadas de lluvias en El Espinal, de marzo a mayo y de octubre a noviembre; con respecto a La Mesa no se obtuvieron reportes en los que se haga referencia a las épocas de lluvia. Ogden y Lindsay en agosto del 2016, sugieren al cambio climático como un controlador de aparición y reinfección de enfermedades de transmisión vectorial, afirmando que los cambios en el uso del suelo, las prácticas agrícolas, las poblaciones humanas y el hábitat, son los principales impulsores de la transmisión de las enfermedades infecciosas; sin embargo, la sensibilidad de los artrópodos al tiempo y al clima, plantea la posibilidad de que dentro de las enfermedades infecciosas, las que se transmiten por artrópodos pueden ser las que tienen más posibilidades de ser afectadas por el cambio climático. No obstante que el aumento de temperatura y de humedad pueden tener un efecto positivo en el tiempo de desarrollo de las garrapatas, así como favorecer un ciclo de vida más corto. En cuanto a la humedad, aumenta la actividad y reduce la mortalidad de estos vectores. Sin embargo, las temperaturas muy elevadas por un lado y el aumento de precipitaciones por otro, inhibe la actividad de las garrapatas (Ogden & Lindsay, 2016; Dantas, 2015). Igualmente, se debe tener en cuenta que es difícil de predecir el sistema de transmisión de los patógenos dependientes de estos vectores con los cambios climáticos (Dantas, 2015).

Otra posible causa de la ausencia del patógeno, tanto por PCR como por frotis sanguíneo, puede coincidir con el tipo de muestra, época del año (ciclos biológicos epidemiológicos) y la epidemiología de cada zona. Además de estar en una zona con presentación del vector, que pudo haber inmunizado a estos caninos, de los cuales muchos han estado su vida entera en estas zonas

y posiblemente tengan memoria antigénica, ya que en el año 2010 Smail, Bloch y McBride, afirmaron que en varios estudios con modelos murinos sugieren que la inmunidad primaria y secundaria contra la *Ehrlichia* está mediada principalmente por la inmunidad celular, células T CD4 productoras de IFN $\gamma$  (células Th1), y estas conducen a la activación de macrófagos y a la inducción de mecanismos bactericidas conduciendo a la eliminación de bacterias. La inmunidad humoral parece desempeñar también un papel importante en la protección contra la infección de *Ehrlichia*, como lo demuestra la seroconversión significativa en los animales que se recuperan de la enfermedad; adicionalmente en estos estudios se encontraron anticuerpos específicos que protegen a los ratones de la infección con *Ehrlichia*.

En cuanto a *Anaplasma*, similar a la inmunidad contra *Ehrlichia*, está mediada por mecanismos celulares y humorales. En general, se cree que los animales que desarrollan títulos de anticuerpos altos, están protegidos contra reinfecciones, ya que estos títulos pueden durar hasta 3 años, sin embargo, no está claro si esta persistencia de anticuerpos sea debido a la persistencia de la enfermedad o a reinfecciones.

Adicionalmente, se debe hacer énfasis en que existen varios tipos de Rickettsias, por lo que las pruebas detectoras de anticuerpos pueden tener reacción cruzada entre sí y generar resultados positivos por pruebas SNAP. A pesar de que la PCR usada es una PCR multiplex que detecta:

- Rickettsia conorii, Rickettsia felis, Rickettsia rickettsii, Rickettsia japónica, Rickettsia typhi
- Anaplasma bovine, Anaplasma centrale, Anaplasma marginale, Anaplasma platys, Anaplasma ovis, Anaplasma phagocytophilum.
- Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Ehrlichia ruminatum, Ehrlichia muris, Ehrlichia ovina.

En mamíferos se pueden citar bacterias que no están incluidas en esta prueba, que pueden o no generar un cuadro clínico en caninos. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, una especie de Ehrlichia, la cual tiene como únicos hospedadores detectados hasta el momento roedores en

Japón, China e Italia, encontrada en garrapatas Ixodes, a pesar de esto se ha detectado en algunos mapaches en Georgia, Estados Unidos. (Dergousoff & Chilton, 2011); *Ehrlichia sennetsu*, implicada en patología humana, con distribución geográfica en Japón y Malasia (Oteo & Brouqui, 2005). Debido a que la prueba molecular de PCR cubre todos los agentes Rickettsiales de mayor prevalencia reportados en mamíferos y tuvieron resultados negativos se concluye que es muy poco probable que estuviese el agente infeccioso en los caninos.

Por otro lado, los resultados arrojados por la prueba SNAP deja ver que no existe evidencia serológica de *Borrelia burgdorferi* y *Dirofilaria immitis*, tal como se menciona en el estudio de Cepeda y Zapata en el 2013 en la ciudad de Bogotá, y en uno reportado por Carrillo en el 2012 en la ciudad de Medellín.

Nueve caninos fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra dos géneros de la familia Anaplasmataceae, *E. canis/E. ewingii* y *A. phagocytophilum/A. platy*, así como en varios estudios (Cartagena, Ríos, & Cardona, 2015; Quijada, y otros, 2012). Debe tenerse en cuenta la duración de los anticuerpos contra estos patógenos, el estadio de la enfermedad y el cuadro clínico del paciente estudiado.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1. Conclusiones

Se hizo notoria la presencia de caninos positivos a la detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis*/ *E. ewingii* y *Anaplasma platys*/ *A. phagocytophilum*. Esto permite concluir que los animales han estado expuestos a la enfermedad. Adicionalmente no se encontró ningún animal serológicamente positivo de forma exclusiva a *Anaplasma*, pese a que hubo animales positivos a *Anaplasma* y a *Ehrlichia* de forma conjunta, la mayoría de estos caninos no tenía signos clínicos concordantes con la gravedad que deberían estar presentando con estos resultados, esto permite concluir, que una prueba de SNAP no es concluyente para definir el tratamiento y el diagnóstico de un animal.

Se debe tener en cuenta que no obstante a la zona geográfica del estudio, los signos clínicos encontrados en los caninos, la anamnesis y los resultados hematológicos compatibles con este tipo de infecciones; se encontraron 26 caninos positivos a *E. canis*/*E. ewingii* y 9 a *E. canis*/*E. ewingii* y *A. phagocytophilum*/*A. platys*, pero con resultados negativos a PCR. Se concluye que los caninos están en una fase crónica, donde se detectan los anticuerpos, más no se detecta genoma de los patógenos. Es decir, se debe considerar una exposición previa a agentes rickettsiales, pero no una condición clínica aguda de la enfermedad, ya que se pueden encontrar en un estado resolutorio de esta.

Debido a que la prueba de SNAP usada en este estudio, arrojó un 70% de positivos a presencia de anticuerpos contra estos patógenos. Por tal motivo, la no evidencia de estos microorganismos con los métodos de PCR y frotis sanguíneo, hace necesario que se deba

reevaluar el tratamiento de estos animales, teniendo en cuenta los diagnósticos diferenciales y/o las fases de infección.

Lo anterior permite concluir que se puede caer en el error de comenzar un antibiótico terapia dirigida a este grupo de bacterias, dando por hecho que los caninos, al tener este conjunto de signos (anamnesis, resultados de hemograma y pruebas serológicas positivas) padecen de estas enfermedades. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las pruebas serológicas cualitativas detectoras de anticuerpos pueden tener reacciones cruzadas con otros agentes que se puedan asemejar.

A pesar de los resultados negativos del PCR, no se puede descartar una reincidencia o una infección crónica, ya que el diagnóstico por PCR es ideal realizarlo en estadios tempranos de la enfermedad, cuando hay rickettsemia. El diagnóstico puede ser más sensible con la ejecución de cultivo bacteriano.

## **7.2. Recomendaciones.**

Teniendo presente que las pruebas de PCR y de extendido tuvieron resultados negativos, pero las pruebas de SNAP arrojaron resultados positivos, se hace necesario realizar pruebas serológicas de inmunofluorescencia pareada o ELISA titulada (para evaluar la seroconversión o cambios de los títulos de anticuerpos), estas pruebas deberían realizarse con intervalos de 15 a 25 días para establecer variación en los títulos de anticuerpos y de esta forma poder definir si se encuentra la fase aguda o crónica de la enfermedad.. Es por esto que se debería utilizar serología pareada y pruebas de PCR para la identificación de procesos infecciosos agudos (de dos a tres semanas después del inicio de la infección y después de su tratamiento). A su vez considerar una prueba de cuantificación de títulos en una infección reciente y poder establecer los títulos de anticuerpos contra estos patógenos.

Hay que capacitar a los médicos veterinarios sobre el diagnóstico de enfermedades rickettsiales y que consideraciones técnicas y clínicas se deben tener en cuenta en la utilización de pruebas en serie para el diagnóstico en cuadro compatibles con estas infecciones.

Teniendo presente los resultados de esta investigación se recomienda a los médicos veterinarios dedicados a la clínica de animales de compañía la implementación de protocolos de diagnóstico que incluyan, la evaluación clínica, las pruebas en serie para el establecimiento verdadero de un cuadro de infección Rickettsia lo cual va a garantizar la adecuada terapéutica y seguimiento de la evaluación los casos clínicos.

Se debe considerar la utilización de pruebas en serie para el diagnóstico de cuadros compatibles con infecciones rickettsiales. Estas pruebas deben comprender:

- Cuadro hemático
- Evaluación de extendido sanguíneo
- Pruebas SNAP
- Serología medidora de títulos de anticuerpos
- Pruebas de PCR, convencional y en tiempo real, a partir de sangre periférica o de aspirado de nódulos linfáticos del animal.
- Citologías de punciones con aguja fina en nódulos linfático, bazo e hígado

Se debe realizar seguimiento clínico mediante la utilización de pruebas de serología y PCR en serie o de forma pareada.

Se recomienda considerar un mayor tamaño de muestra y realizar este tipo de estudios en diferentes zonas geográficas y épocas del año de Colombia, para tener una mejor aproximación a los diferentes diagnósticos que se pueden realizar, teniendo en cuenta el estado de infección en el que esté presente el canino. Además, investigar que microorganismos pueden o no generar

reacción cruzada en pruebas serológicas, realizando pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para cada agente rickettsial y pruebas de PCR que detecten otras rickettsias

Se recomienda también realizar estudios que identifiquen otros reservorios de estos microorganismos, como en los bovinos, por ejemplo. Realizar muestreos en diferentes épocas del año, realizar pruebas más sensibles como la PCR en tiempo real a partir de aspirado de nódulo linfático y la realización de serologías pareadas, para identificar la dinámica de la infección.



## 8. LISTA DE REFERENCIAS

- (CDC) Center of Disease Control and prevention. (1 de junio de 2015). (CDC) *Center of Disease Control and prevention*. Obtenido de <http://www.cdc.gov>
- Acero, E., Calixto, O., & Prieto, A. (2011). Garrapatas (Acari: Ixodidae) prevalentes en caninos no migrantes del noroccidente de Bogotá, Colombia. *Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS*, 9(15), 158-165.
- Akgöz, A., Mukundan, S., & Lee, T. (2012). Imaging of Rickettsial, Spirochetal, and Parasitic Infections. *Neuroimaging Clinics of North America*, 22(4), 633-657.
- Almazán, C., González, V., Fernández, I., Cabezas, A., Rodríguez, R., & de la Fuente, J. (2015). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and tick-borne Diseases*, 1-8.
- Alves, R., Levenhagen, M., Levenhagen, M., Rieck, S., Labruna, M., & Beletti, M. (2014). The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Veterinary Microbiology*, 168(2.4), 442-446.
- Anda, P., Blanco, J., Jado, I., Marin, M., Oteo, J., Pons, I., . . . Sanfeliu, I. (2007). *Researchgate*. (E. Cercenado, & R. Cantón, Edits.) Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica, DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR PATÓGENOS BACTERIANOS EMERGENTES: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*. : <https://www.researchgate.net>
- Bakken, J., & Dumler, S. (2015). Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 341-355.
- Bird, K. E. (2011). The Hematologic and Lymphoid Systems. En M. Peterson, & M. Kutzler, *Small Animal Pediatrics THE FIRST 12 MONTHS OF LIFE* (págs. 305-327). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Blagburn, B., & Dryden, M. (2009). Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 39, 1173-1200.

- Bottari, N., Crivellenti, L., Borin-Crivellenti, S., Oliveira, J., Coelho, S., Contin, C., . . . Da Silva, A. (2016). Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by Ehrlichia canis: Acute and subclinical disease. *Microbial Pathogenesis*, 92, 26-29.
- Breitschwerdt, E. (2007). Patógenos Bacterianos Intracelulares Obligados. En S. Ettinger, & E. Feldman, *Tratado de Medicina Interna Veterinaria enfermedades del perro y el gato* (Vol. 1, págs. 631-636). Madrid, España: Elsevier.
- Carmo, G., Crivellenti, L., Bottari, N., Machado, G., Borin-Crivellenti, S., Moresco, R., . . . Da Silva, A. (2015). Butyrylcholinesterase as a marker of inflammation and liver injury in the acute and subclinical phases of canine ehrlichiosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 43, 16-21.
- Carrade, D., Foley, J., Borjesson, D., & Sykes, J. (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *J Vet Intern Med*(23), 1129-1141.
- Carrillo, L. (2012). Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de Ehrlichia spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(2).
- Carrillo, L., Betancur, S., Roldán, D., Pérez, J., Galeano, D., Loaiza, E., & Giraldo, C. (2012). Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de Ehrlichia spp., en caninos de Medellín (Colombia). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(2).
- Cartagena, L., Ríos, L., & Cardona, J. (2015). Seroprevalencia de Ehrlichia canis en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Revista de Medicina Veterinaria*(29), 51-62.
- Cepeda, O., & Zapata, J. (2013). DETECCIÓN SEROLÓGICA POR ELISA INDIRECTA DE HEMOPARÁSITOS Y Dirofilaria immitis EN CANINOS EN BOGOTÁ, COLOMBIA. (Tesis de Pregrado).
- Cicuttin, G., Vidal, P., De Salvo, M., Beltrán, F., & Gury, F. (2014). Detección molecular de Rickettsia massiliae y Anaplasma platys en garrapatas Rhipicephalus sanguineus y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 563-568.
- Cohn, L. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *The veterinary clinics small animal practice*, 33, 863-884.
- Cortazar, A., & Silva, E. (2004). PCR. *MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGÍA*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Obtenido de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

- Cortez, J. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. *XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical* (págs. 268-271). Bogotá: Biomédica.
- Dahmania, M., Loudahia, A., Mediannikova, O., Fenollara, F., Raoulta, D., & Davousta, B. (2015). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(2), 198-203.
- Daniel, W. (2005). *BIOESTADISTICA, BASE PARA EL ANALISIS DE LA SALUD*. Limusa Wiley.
- Dantas, F. (2015). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 452-461.
- de la Fuente, J., Estrada, A., Cabezas, A., & Kocan, K. (2015). *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trends in Microbiology*, 1-8.
- de la Fuente, J., Estrada, A., Cabezas, A., & Kocan, K. (2015). *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trend in microbiology*, 1-8.
- Dergousoff, S., & Chilton, N. (2011). Novel genotypes of *Anaplasma bovis*, “Candidatus *Midichloria*” sp. and *Ignatzschineria* sp. in the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Veterinary Microbiology*, 150, 100-106.
- Dolz, G., Abrego, L., Romero, L., Campos, L., Bouza, L., & Jimenez, A. (2013). Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta médica costarricense*, 55, 34-40. Obtenido de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022013000400008&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022013000400008&lng=en&tlng=en).
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología Molecular*. Mexico.
- Faccioli, V. (2011). GARRAPATAS (ACARI: IXODIDAE Y ARGASIDAE) DE LA COLECCIÓN DE INVERTEBRADOS DEL MUSEO PROVINCIAL DE CIENCIAS NATURALES FLORENTINO AMEGHINO. Santa Fe, Argentina. Obtenido de <http://www.unl.edu.ar/santafe/museocn.htm>
- Fernandez S., P. (2003). Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. *Tesis doctoral*. Universidad de Salamanca, Facultad de Biología.
- Font, A., Closa, J., & Mascort, J. (1994). Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 233-235.

- Fritz, C. (2009). Emerging Tick-borne Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(2), 265-278.
- Frontline. (s.f.). *Frontline*. Obtenido de <http://www.frontlinecombo.es>
- Gonsales, F., Kuribayashi, J., Bombardieri, C., Martins, M., & Kuribayashi, M. (2009). Characterization of hematological and immunological parameters during sub clinical phase of Ehrlichia canis infection in dogs. (Elsevier, Ed.) *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 341.
- Guillemi, E., Tomassone, L., & Farber, M. (Diciembre de 2015). Tick-borne Rickettsiales: Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 87-97.
- Harrus, S. (2015). Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *The Veterinary Journal*, 204(3), págs. 239-240.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. *The Veterinary Journal*, 187, 292–296.
- Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E., & Bark, H. (1997). Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec*, 10(141), 73-76.
- Harvey, J. (2012a). Evaluation of Leukocytic Disorders. En S. Ian, J. Lowe, & A. Stevens, *Veterinary Hematology A Diagnostic Guide and Color Atlas* (págs. 122-176). Elsevier.
- Harvey, J. (2012b). Evaluation of Hemostasis: Coagulation and Platelet Disorders. En S. Ian, J. Lowe, & A. Stevens, *Veterinary Hematology A Diagnostic Guide and Color Atlas* (págs. 191-233). Elsevier.
- Huerto, E., & Dámaso, B. (2015). Factores asociados a la infección por Ehrlichia canis en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 756-760.
- Ismail, N., Bloch, K., & McBride, J. (2010). Human Erlichiosis and Anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 261–292.
- Kidd, L., & Breitschwerdt, E. (2011). Diseases Formerly Known as Rickettsial: The Rickettsioses, Ehrlichioses, Anaplasmoses, and Neorickettsial and Coxiella Infections. En M. Peterson, & M. Kutzler, *SMALL ANIMAL PEDIATRICS: THE FIRST 12 MONTHS OF LIFE* (págs. 143-153). St. Louis, Missouri: ELSEVIER.
- L., P. (s.f.). *Ortocanis*. Obtenido de <http://www.ortocanis.com/es/content/91-el-golpe-de-calor>

- Lee, S., Lee, S., VanBik, D., Kim, N., Kim, K., Goo, Y., . . . Kwak, D. (2016). First molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* in shelter dogs in Seoul, Korea. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(5), 945-950.
- Litle, S. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1121-1140.
- Little, S. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics: Small animal practice*, 40, 1121-1140.
- Meyer, D., & Harvey, J. (2000). El laboratorio en medicina veterinaria.
- Montes, F., De la Vega, F., Bello, A., & Fortich, A. S. (2012). COINFECCIÓN DE BABESIOSIS Y EHRlichIOSIS: UN CASO EN CARTAGENA DE INDIAS, COLOMBIA\*. *REVISTA CIENCIAS BIOMÉDICAS*.
- Montgomery, D. (2002). *Diseño y analisis de experinmentos*. Thomson.
- Moumene, A., & Meyer, D. (2016). Ehrlichia's molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes and Infection*, 18(3), 172-179.
- Mylonakis, M., Koutinas, A., Billinis, C., Leontides, L., Kontos, V., Papadopoulos, O., . . . Fytianou, A. (2003). Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. (Elsevier, Ed.) *Veterinary Microbiology*, 91, 197-204.
- Nicholson, W., Allen, K., McQuiston, J., Breitschwerdt, E., & Peco, S. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, 26(4), 205-212.
- Ogden, N., & Lindsay, L. (2016). Effects of Climate and Climate Change on Vectors and Vector-Borne Diseases: Ticks Are Different. *Trends in parasitology*, 32(8), 646-656.
- Oteo, J., & Brouqui, P. (2005). Ehrlichiosis y Anaplasmosis humana. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 23(6), 375-380.
- Packman, S. (2016). Hipertermia y pirexia. En T. Hutchinson, & K. Robinson, *Manual de Medicina Canina*. Lexus.
- Paulino, A. (2011). Detección serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia Chaffeensis* en humanos que realizan actividades veterinarias en Lima Metropolitana. Lima, Perú. Obtenido de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/>
- Quijada, J., García, M., Bethencourt, A., Medina, O., Isis, V., & García, H. (2012). Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de Venezuela. *Revista electrónica de Veterinaria*.

- Ramsey, I., Gunn-More, D., & Shaw, S. (2012). Sistemas hematopoyetico y linforeticular. En I. Ramsey, & B. Tennant, *Manual de Enfermedades Infecciosas en pequeños animales* (pág. 85.117). Ediciones.
- Rar, V., & Golovljova, I. (2011). Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*(11), 1842-1861.
- Ravnik, U., Premrov, B., Lusa, L., & Tozon, N. (2014). Serum protein profiles, circulating immune complexes and proteinuria in dogs naturally infected with Anaplasma phagocytophilum. *Veterinary Microbiology*, 173, 160-165.
- Sellon, R. (2003). Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(4), 677-693.
- Storz, J. (1990). Rickettsiae and Chlamydiae. En G. Carter, & J. Cole, *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology* (págs. 309-331). Academic press.
- Tanikawa, A., Labruna, M., Costa, A., Aguiar, D., Justiniano, S., Mendes, R., . . . Azevedo, S. (2013). Ehrlichia canis in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 474-477.
- Torres, F., & Otranto, D. (2016). Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. *Trends in Parasitology*, 32(1), 43-55.
- Vargas, G., André, M., Faria, J., Munhoz, T., Hernandez, M., Machado, R., & Tinucci, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186, 254-260.
- Vetpraxis. (2010). Obtenido de [www.vetpraxis.com](http://www.vetpraxis.com)
- Villaescusa, A., García, M., Rodríguez, F., Tesouro, M., & Sainz, A. (2015). Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with Ehrlichia canis. *The Veterinary Journal*, 204(3), 263-268.
- Villiers, E. (2013). Introducción a la Hematología. En E. Villiers, & L. Blackwood, *Manual de Diagnóstico de Laboratorio en pequeños animales* (págs. 33-46). Barcelona: Ediciones S.
- Walpole, R. (2007). *Probabilidad y estadística para Ingeniería*. Pearson Educación.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., & Cornelissen, A. (2001). Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the

diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis. *Veterinary Parasitology*, 95, 1-15.

Warner, R., & Marsh, W. (2002). Rocky Mountain spotted fever. *Zoonosis Update*, 221(10).

Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of Anaplasma phagocytophilum. *Veterinary Parasitology*, 167, 108-122.

## 9. ANEXOS

### Anexo A. Encuesta de remisión de muestras

FECHA: NOMBRE DEL CANINO: HISTORIA ESPECIE:  
 CLÍNICA:  
 RAZA: SEXO: EDAD: PESO: PROCEDENCIA:  
 PROPIETARIO: REMITENTE:  
 TELÉFONO: CORREO ELECTRÓNICO

*TODAS LAS MUESTRAS DEBEN SER REFRIGERADAS Y ENVIADAS INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA TOMA O CONGELADAS A -20°C Y LUEGO SER ENVIADAS.*

SANGRE (Tubo EDTA)	Lámina frotis sanguíneo
--------------------	-------------------------

Signos clínicos: marque con una X la que presente el canino. En caso de haber algo adicional a lo que está en este formato indicarlo en observaciones.

#### CANINO

1.	7.	
2.	8.	
3.	9.	
4.	10.	
5.	11.	
6.	Observaciones.	

1. Pérdida de peso.
2. Depresión.
3. Esplenomegalia.
4. Epistaxis.
5. Equimosis en piel y membranas mucosas.
6. Anorexia.
7. Fiebre.
8. Linfadenomegalia.
9. Descarga oculonasal.
10. Uveítis.
11. Signos SNC.

POSITIVO/NEGATIVO

SEROLOGÍA  \_\_\_\_\_

SNAP  \_\_\_\_\_

CUADRO HEMÁTICO

FROTIS SANGUÍNEO  OBSERVACIONES ADICIONALES: \_\_\_\_\_



## **Anexo B. Formato de consentimiento informado**

Su mascota ha sido seleccionada a participar en una investigación sobre enfermedades rickettsiales y su transmisión, mediante una prueba de biología molecular (PCR) que será aplicada a una muestra de sangre de su mascota. Esta investigación es realizada por la Dra. Isabel María Ricardo, dirigida por el Dr. Ricardo Piñeros.

El propósito de esta investigación es diagnosticar enfermedades rickettsiales por medio de PCR y analizar la efectividad del diagnóstico comparándolo con una prueba SNAP (la cual realizará su médico veterinario) adicionalmente se deberá tener un cuadro hemático el cual también será realizado por el médico veterinario tratante de su mascota. De tal forma que el proyecto de investigación se hará cargo de los gastos de la prueba de PCR de su mascota.

Si acepta participar en esta investigación, se le solicitará realizar la siguiente actividad: se tomarán sus datos personales, los datos de su mascota, la historia clínica y los resultados de cuadro hemático y prueba SNAP. Para desarrollar este proyecto es necesario contar con su aprobación para extraer muestras de sangre de su mascota que serán procesadas en el laboratorio con el fin de determinar si tu mascota tiene una infección rickettsial y que agente rickettsial la está infectando.

Los riesgos que conlleva la toma de muestra son inflamación y dolor de la zona de extracción de sangre. El beneficio de esta prueba es que al ser parte de esta investigación su mascota obtendrá una prueba diagnóstica avanzada llamada PCR la cual consiste en identificar por medio de biología molecular al agente causal de la infección analizando su ADN.

Confidencialidad: la identidad del participante y el resultado de la prueba serán mantenidos bajo estricta confidencialidad y posteriormente se entregará el resultado del examen a cada propietario. Ni usted, ni los investigadores participantes en este proyecto, recibirán incentivo monetario ni contraprestación alguna por participar en este estudio.

Derechos: teniendo conocimiento de lo anteriormente leído, usted es libre de tomar la decisión de permitir la participación de su mascota en este estudio, accediendo de forma voluntaria a los requerimientos establecidos y tiene derecho a abstenerse de participar.

También tiene derecho a reservarse información que considere y que no afecte el desarrollo de esta investigación.

Su firma en este documento significa que ha decidido permitir la participación de su mascota después de haber leído y discutido la información referente al proyecto de investigación expuesto en esta hoja de consentimiento.

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_ De \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

He discutido el contenido de esta hoja de consentimiento con el arriba firmante.

Le he explicado los riesgos y beneficios del estudio.

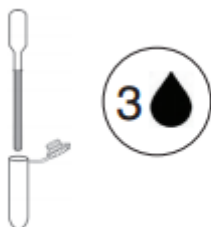
Nombre del médico veterinario que remite la muestra: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_ TP. \_\_\_\_\_

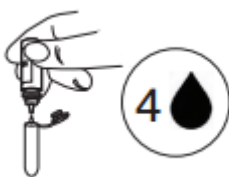
Firma \_\_\_\_\_

### Anexo C. Procedimiento de la prueba SNAP 4Dx Plus de IDEXX

- 1) Si los componentes están almacenados en refrigerador se debe esperar a que se equilibren a temperatura ambiente durante 30 minutos. No calentarlos.
- 2) Con la pipeta del kit, verter 3 gotas de muestra en un tubo de ensayo nuevo.



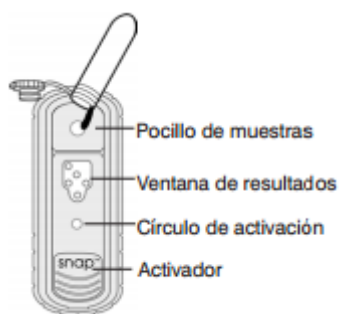
- 3) Añadir 4 gotas de conjugado al tubo de ensayo sosteniendo la botella en posición vertical.



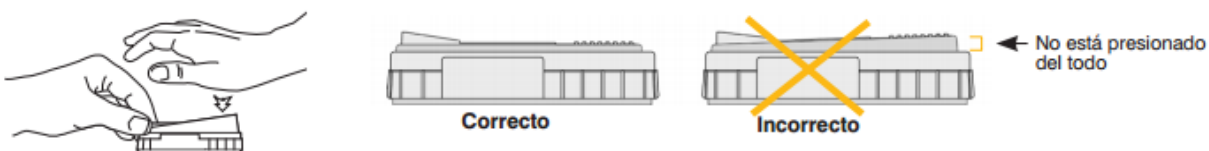
- 4) Tapar el tubo de ensayo y mezclarlo a fondo invirtiéndolo entre 3 y 5 veces.



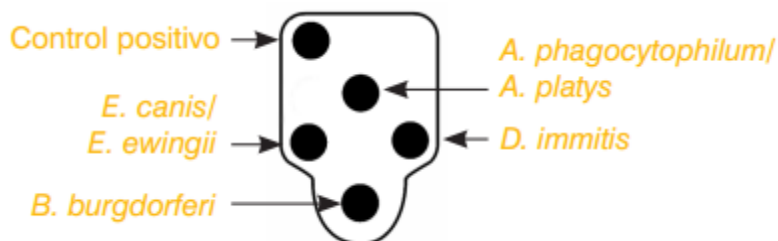
- 5) Colocar el dispositivo sobre una superficie horizontal. Añadir todo el contenido del tubo de ensayo en el pocillo de muestras, teniendo cuidado de no verter el contenido fuera de dicho pocillo. La muestra fluirá por la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30–60 segundos. Es posible que quede algún resto de la muestra en el pocillo. La muestra fluirá por la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30–60 segundos. Es posible que quede algún resto de la muestra en el pocillo.



- 6) En cuanto aparezca color en el círculo de activación, presionar el activador con firmeza hasta que quede al ras con el cuerpo del dispositivo. Nota: es posible que alguna muestra no fluya hacia el círculo de activación dentro de los 60 segundos, y, por lo tanto, el círculo no se coloreará. En ese caso, presionar el activador después de que la muestra haya fluido por la ventana de resultados



- 7) Leer los resultados del análisis cuando hayan pasado 8 minutos. Nota: Puede ocurrir que el punto del control positivo desarrolle antes el color; sin embargo, la prueba no se habrá completado hasta que no pasen los 8 minutos.



## Anexo D. Proceso de purificación de ADN

### PROCESO DE PURIFICACIÓN DE ADN CON EL KIT COMERCIAL THERMO SCIENTIFIC GENEJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT #K0721, #K0722

- Se realiza una primera centrifugación 5000 rpm, se elimina el sobrenadante, depositando las células en un tubo de 1,5 o 2ml y se vuelve a centrifugar durante otros 10 minutos a 5000 rpm, volviendo a descartar el sobrenadante.
- Se re suspende el precipitado en 180µl de la solución de digestión. A esto se le añade 20µl de solución de Proteinasa K, mezclando bien para obtener una suspensión uniforme.
- Se incuba la muestra a 56°C mezclando ocasionalmente hasta que las células se lisen por completo (aproximadamente 30 minutos)
- Añadir 20µl de la solución ARNasa, mezclar por agitación y se incuba la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se añade 200µl de la solución de Lisis de muestra, se mezcla bien por agitación durante 15 segundos hasta que se obtenga una muestra homogénea.
- Luego se adiciona 400µl de etanol al 50% y se mezcla por agitación o con la pipeta.
- Transferir el preparado lisado a una columna de GeneJET Genomic DNA Purification, centrifugar el tubo durante un minuto a 6000rpm y luego poner en un tubo de 2ml
- Se debe añadir 500µl del tampón de lavado (con etanol incluido) y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm, se desecha el filtrado y se pone de nuevo en el tubo de recogida del kit
- Se adicionan 500µl del tampón de lavado II (con etanol añadido) al tubo GeneJET Genomic DNA Purificación. Se debe centrifugar durante 3 minutos a velocidad máxima ( $\geq 12000$ rpm).
- Se añaden 200µl del tampón de elución al centro de la membrana de la columna del kit para extraer el ADN genómico. Se debe dejar reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugar durante un minuto a 8000rpm.
- Se debe usar el ADN genómico de inmediato o si se va a usar después, se debe almacenar a una temperatura de 20°C

## **Anexo E. Preparación de las garrapatas para la purificación de ADN**

### **Procedimiento realizado con las garrapatas por el Dr. Pedro Fernández Soto en su tesis**

- Las garrapatas retiradas de un solo canino se depositaron en un tubo cerrado junto con un algodón humedecido con agua. El tubo fue rotulado con los datos del animal del cual se extrajeron los ectoparásitos y se enviarán lo antes posible para su estudio. En caso de que no sea posible realizar el envío de forma rápida serán preservadas y enviadas en etanol al 70%.
- Tras su identificación, los ejemplares serán descontaminados superficialmente mediante inmersión en etanol al 70% durante 10 minutos.
- Luego de ser descontaminadas las garrapatas de cada animal, serán seccionadas longitudinalmente con bisturí estéril para permitir la salida del contenido interno el cual se almacenará en tubos de 1,5ml, identificando nuevamente los mismos.

## Anexo F. Recolección de datos de los caninos

No. ID	NOM	EDAD	SEXO	RAZA	GARI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	OTRO
1	CORBAT/	2 H		MESTIZO	X	37,6	X										
2	PITUFA	3 H		MESTIZO	X	38,7							X				
3	ROLITA	1 H		MESTIZO	X	37,8											
4	PERRITO	2 M		MESTIZO	X	39,2	X	X					X				MUCOSAS PAL
5	MINI	3 H		MESTIZO		37,4											
6	NEGRITA	3 H		MESTIZO	X	36,8		X									
7	PATERA	1 H		MESTIZO		37,6	X					X					
8	DIABLA	5 H		MESTIZO	X	37,8											
9	CATIRE	4 H		MESTIZO		39,5						X	X				
10	BARBITA	3 H		MESTIZO		39,8	X						X				
11	TAZMAN	3 H		MESTIZO		39							X				
12	ROCCO	2 M		APBT		38,6						X					
13	PININA	3 H		MESTIZO	X	39,1		X				X	X				
14	NATASH/	2 H		MESTIZO	X	37,5						X					
15	NIÑA	1 H		SHARPEI		38,8							X				
16	DANGER	5 M		MESTIZO		39											
17	CARRUCI	3 H		MESTIZO	X	37,6						XX					
18	LUNA	1 H		MESTIZO	X	38							X				
19	JOSEFA	6 H		MESTIZO		38,7							X				
20	LINDA	3 H		MESTIZO	X	38,5							X				
21	GENECA	5 H		MESTIZO	X	38,6											
22	BLANCA	8 H		MESTIZO		39,8	X						X				ENCIAS SANGR
23	TIGRESA	4 H		MESTIZO	X	38,9	X						X				
24	KIRA	5 H		RW		39	X						X				
25	RENZO	4 M		RW		38,6											
26	LEONA	6 H		MESTIZO		39,9	X	X					X				
27	NEGRO	6 M		MESTIZO	X	37,5				X							
28	NIGA	3 M		MESTIZO		36,8		X	X			X					hematoquesia
29	CAFÉ	4 M		MESTIZO		37,4	X										
30	MOROCCI	2 H		MESTIZO	X	37,8		X									
31	MANCH/	1 H		MESTIZO		37,7							X				
32	NUBE	3 H		MESTIZO		38								X			
33	AMARGL	6 H		MESTIZO	X	37,6	X										
34	AGATHA	3 H		MESTIZO	X	38,4							X				
35	LUNA 1	7 H		MESTIZO	X	37,5							X				poliartritis
36	AQUILES	3 M		RW		39,6		SM									
37	NIÑA	6 H		FP	X	37,4	X					X					
38	PECAS	3 H		DALMATA		37,9	X										
39	TOBY	2 M		GOLDEN		36,9		X									
40	PRINCES	5 H		FP		37,8											
41	BELLA	3 H		MESTIZO		38,2		X									
42	ROSA	2 H		MESTIZO	X	37,4											
43	MECHUC	7 H		MESTIZO	X	39											
44	TOÑA	3 H		BULLDOG	X	40		P,SM	X								ENCIAS SANGR
45	CANELA	4 H		MESTIZO	X	37											
46	LUNA 2	5 H		FP	X	37,6											
47	LAICO	7 M		BORDER C	X	37,8											
48	NATASH/	9 H		FP		37,4	X						X	X			ENCIAS SANGR
49	KIRA	6 H		FP		38,5		P,SM									
50	MILO	2 M		JACKR		39	X	SM				X	X				

1	FIEBRE
2	ANOREXIA
3	LINFOADENOMEGALIA
4	DESCARGA OCUONASAL
5	UVEITIS
6	SIGNOS DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
7	PERDIDA DE PESO
8	DEPRESION
9	ESPLENOMEGALIA
10	EPISTAXIS
11	EQUIMOSIS EN PIEL Y MEMBRANAS MUCOSAS
OTRO	

Donde los sombreados con color verde son procedentes de El Espinal y los sombreados de color azul son procedentes de La Mesa.

### Anexo G. Signos con mayor relevancia y su presentación en los animales estudiados

SIGNOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1		X		X					X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
2	X			X			X			X												X	X	X		
3				X		X							X													
4																										
5																										
6							X		X			X	X	X			X	X	X	X			X	X		
7		X		X					X	X	X		X		X								X			

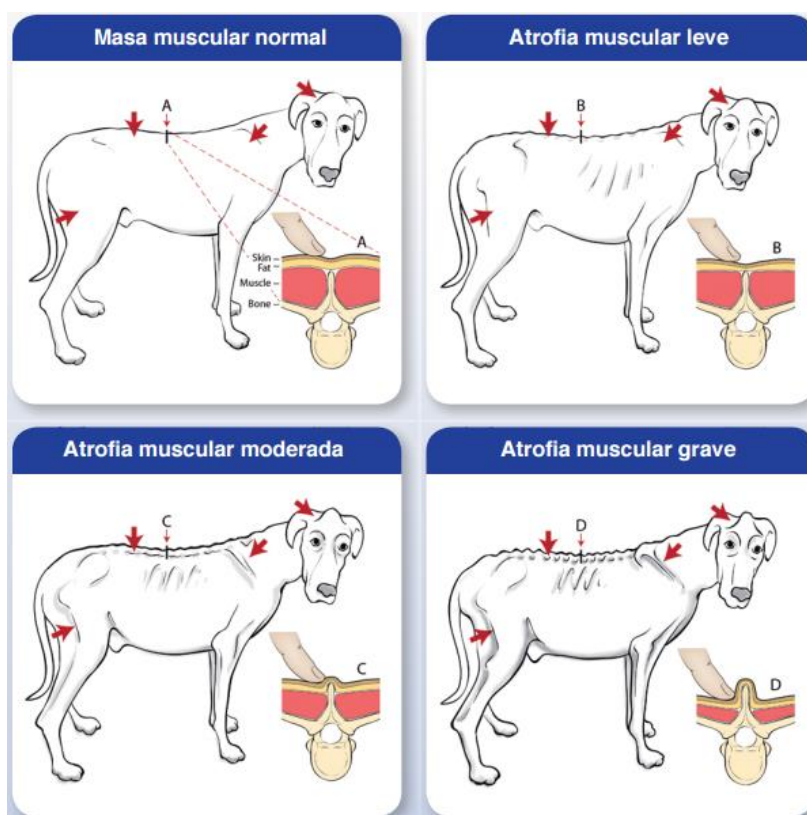
SIGNOS	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1	X										X							X	X					X	X
2	X			X				X				X	X										X		X
3	X		X	X							X			X		X			X					X	X
4		X	X																X						
5												X													
6				X					X														X		X
7	X					X	X			X													X		X

Tabla 4. Signos encontrados en cada canino incluido en el estudio. Se organizó en dos tablas debido al tamaño que abarca. Teniendo en cuenta que los animales numerados del 1 al 23 son del grupo 1 (La mesa) y del 24 al 50 del grupo 2 (El Espinal).



**Anexo H. Puntuación de condición muscular del comité de nutrición global del WSAVA, utilizada en el Exámen clínico de los caninos evaluados**

“La puntuación de condición muscular se evalúa mediante visualización y palpación de la columna, las escápulas, el cráneo y las alas del ilion. La atrofia muscular típicamente se nota primero en los músculos epaxiales a los lados de la columna; la atrofia muscular en otras localizaciones es más variable. La puntuación de condición muscular se define como normal, atrofia leve, atrofia moderada o atrofia grave. Nótese que los animales pueden tener atrofia muscular significativa incluso si tienen sobrepeso (puntuación de condición corporal  $> 5$ ). A su vez, los animales pueden tener una puntuación de condición corporal baja ( $< 4$ ) pero con mínima atrofia muscular. Por lo tanto, asignar tanto la puntuación de condición corporal como la de condición muscular en cada animal en cada visita es importante. La palpación es especialmente importante en casos de atrofia leve y en animales con sobrepeso. Un ejemplo de cada puntuación se muestra a continuación.”



**Anexo I.** Análisis descriptivos de las variables de hemograma para los siguientes grupos según resultado de SNAP: 1) Caninos positivos solo a Ehrlichia ssp. 2) Caninos positivos a Ehrlichia ssp. y Anaplasma ssp. 3) Caninos negativo a SNAP

Descriptivos									
	SNAP	N	Media	Desviación típica	Error típico	la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LEUCOCITOS	1	9	12,578	6,5134	2,1711	7,571	17,584	3,5	26,8
	2	26	14,596	4,9431	,9694	12,600	16,593	5,0	26,3
	3	15	14,393	6,5616	1,6942	10,760	18,027	4,1	25,3
	Total	50	14,172	5,6808	,8034	12,558	15,786	3,5	26,8
ERITROCITOS	1	9	5,444	,9302	,3101	4,729	6,159	3,9	6,7
	2	26	5,958	1,8398	,3608	5,215	6,701	2,0	9,5
	3	15	5,713	1,4510	,3747	4,910	6,517	2,7	8,1
	Total	50	5,792	1,5838	,2240	5,342	6,242	2,0	9,5
HEMOGLOBINA	1	9	118,33	23,801	7,934	100,04	136,63	85	159
	2	26	132,38	39,578	7,762	116,40	148,37	45	216
	3	15	125,20	41,864	10,809	102,02	148,38	60	222
	Total	50	127,70	37,711	5,333	116,98	138,42	45	222
HEMATOCRITO	1	9	,3644	,06327	,02109	,3158	,4131	,28	,45
	2	26	,4042	,11840	,02322	,3564	,4521	,14	,64
	3	15	,3827	,10674	,02756	,3236	,4418	,18	,59
	Total	50	,3906	,10632	,01504	,3604	,4208	,14	,64
VGM	1	9	68,00	3,708	1,236	65,15	70,85	60	72
	2	26	68,62	3,348	,657	67,26	69,97	60	75
	3	15	66,80	6,236	1,610	63,35	70,25	51	75
	Total	50	67,96	4,440	,628	66,70	69,22	51	75
HCM	1	9	21,00	1,658	,553	19,73	22,27	17	23
	2	26	21,69	1,258	,247	21,18	22,20	17	23
	3	15	21,13	2,997	,774	19,47	22,79	17	29
	Total	50	21,40	1,979	,280	20,84	21,96	17	29
CGMH	1	9	317,89	12,534	4,178	308,25	327,52	299	346
	2	26	322,38	10,940	2,146	317,97	326,80	298	338
	3	15	318,67	32,086	8,285	300,90	336,44	283	427
	Total	50	320,46	19,622	2,775	314,88	326,04	283	427
RDW	1	9	14,33	1,732	,577	13,00	15,66	13	18
	2	26	13,96	1,183	,232	13,48	14,44	12	17
	3	15	14,47	,990	,256	13,92	15,02	13	16
	Total	50	14,18	1,240	,175	13,83	14,53	12	18
PLAQUETAS	1	9	280,56	240,598	80,199	95,62	465,50	100	850
	2	26	230,69	94,360	18,506	192,58	268,81	24	501
	3	15	268,47	162,062	41,844	178,72	358,21	81	686
	Total	50	251,00	148,224	20,962	208,88	293,12	24	850

Descriptivos									
	SNAP	N	Media	Desviación típica	Error típico	la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
NEUTROFILOS	1	9	9,000	6,2913	2,0971	4,164	13,836	2,1	23,9
	2	26	9,685	2,7666	,5426	8,567	10,802	4,3	16,0
	3	15	9,573	4,7671	1,2309	6,933	12,213	2,9	20,2
	Total	50	9,528	4,1140	,5818	8,359	10,697	2,1	23,9
LINFOCITOS	1	9	2,644	1,1749	,3916	1,741	3,548	1,1	4,1
	2	26	3,781	2,6947	,5285	2,692	4,869	,5	12,5
	3	15	2,980	1,5749	,4066	2,108	3,852	,3	5,8
	Total	50	3,336	2,2069	,3121	2,709	3,963	,3	12,5
MONOCITOS	1	9	,522	,2863	,0954	,302	,742	,1	1,1
	2	26	,558	,2942	,0577	,439	,677	,1	1,3
	3	15	,847	,7120	,1838	,452	1,241	,1	3,0
	Total	50	,638	,4707	,0666	,504	,772	,1	3,0
EOSINOFILOS	1	9	,433	,3041	,1014	,200	,667	0,0	,8
	2	26	,573	,3144	,0617	,446	,700	,2	1,6
	3	14	1,086	,6803	,1818	,693	1,479	,2	2,5
	Total	49	,694	,5076	,0725	,548	,840	0,0	2,5

### Anexo J. Análisis de varianza realizado a las variantes de hemograma

#### ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LEUCOCITOS	Inter-grupos	25,350	1	25,350	,782	,381
	Intra-grupos	1555,951	48	32,416		
	Total	1581,301	49			
ERITROCITOS	Inter-grupos	,083	1	,083	,032	,858
	Intra-grupos	122,834	48	2,559		
	Total	122,917	49			
HEMOGLOBINA	Inter-grupos	373,399	1	373,399	,259	,613
	Intra-grupos	69309,101	48	1443,940		
	Total	69682,500	49			
HEMATOCRITO	Inter-grupos	,002	1	,002	,212	,648
	Intra-grupos	,551	48	,011		
	Total	,554	49			
VGM	Inter-grupos	8,181	1	8,181	,410	,525
	Intra-grupos	957,739	48	19,953		

HCM	Total	965,920	49			
	Inter-grupos	1,420	1	1,420	,358	,553
	Intra-grupos	190,580	48	3,970		
CGMH	Total	192,000	49			
	Inter-grupos	239,853	1	239,853	,618	,436
	Intra-grupos	18626,567	48	388,053		
RDW	Total	18866,420	49			
	Inter-grupos	9,496	1	9,496	6,918	,011
	Intra-grupos	65,884	48	1,373		
PLAQUETAS	Total	75,380	49			
	Inter-grupos	29665,781	1	29665,781	1,360	,249
	Intra-grupos	1046886,219	48	21810,130		
PROTEINAS	Total	1076552,000	49			
	Inter-grupos	152,075	1	152,075	3,584	,064
	Intra-grupos	2036,905	48	42,436		
ALBÚMINA	Total	2188,980	49			
	Inter-grupos	54,177	1	54,177	1,738	,194
	Intra-grupos	1496,403	48	31,175		
GLOBULINAS	Total	1550,580	49			
	Inter-grupos	387,791	1	387,791	5,252	,026
	Intra-grupos	3544,209	48	73,838		
NEUTROFILOS	Total	3932,000	49			
	Inter-grupos	2,576	1	2,576	,150	,701
	Intra-grupos	826,745	48	17,224		
LINFOCITOS	Total	829,321	49			
	Inter-grupos	,971	1	,971	,196	,660
	Intra-grupos	237,685	48	4,952		

MONOCITOS	Total	238,655	49			
	Inter-grupos	,945	1	,945	4,576	,038
	Intra-grupos	9,913	48	,207		
EOSINOFILOS	Total	10,858	49			
	Inter-grupos	2,337	1	2,337	10,951	,002
	Intra-grupos	10,031	47	,213		
	Total	12,368	48			

### Anexo K. Tabla de resultados de hemogramas

No. ID	LEUC	ERITR	HEM	HTC	VGM	HCM	CGMF	RDI	PLAC	PF	ALI	GLOE	NEU	LIN	MC	EOS	BASOFIL
1	7,2	5,9	121	0,39	66	20	307	14	120	72	39	33	4,7	1,7	0,4	0,4	
2	17,5	6,8	120	0,39	60	17	301	16	273	84	37	47	11,2	4,4	1,1	0,9	
3	10,8	6,6	140	0,41	63	21	335	14	137	76	37	39	6,8	3,2	0,4	0,4	
4	15,6	5,5	127	0,39	71	23	325	13	262	74	33	41	11,9	2,7	0,6	0,5	
5	11,3	7,3	173	0,51	71	23	334	13	210	72	42	30	8,4	2	0,5	0,5	
6	7,3	5,3	103	0,31	60	19	324	15	161	68	31	37	4,6	2,2	0,3	0,2	
7	9,3	5,5	115	0,36	66	21	315	15	143	80	36	44	5,7	2,8	0,5	0,4	
8	12,3	5,7	110	0,34	51	19	317	15	309	76	34	42	7,4	3,1	0,9	1	
9	25,3	5	115	0,36	72	23	318	14	481	64	47	17	20,2	0,8	3	1,3	
10	12,8	<b>2,7</b>	<b>60</b>	<b>0,18</b>	70	22	317	13	254	84	30	54	7,9	2,9	0,8	1,2	agl
11	17,3	6,2	146	0,44	71	23	325	14	171	78	49	29	11,6	4,2	0,9	0,7	
12	17,4	2	45	0,14	74	22	304	14	364	80	34	46	11,8	4,5	0,7	0,3	
13	16,6	4,5	81	0,28	62	17	283	16	686	56	37	19	9,5	4,8	0,7	1,7	
14	13,1	6,2	151	0,46	75	24	323	14	352	66	38	28	9	2,5	0,5	1	
15	24,9	7,5	222	0,51	69	29	427	16	414	78	44	34	16,9	4	1,5	2,5	
16	24,5	3,2	73	0,22	71	22	320	15	255	76	38	38	9,8	<b>12,5</b>	1,2	1	
17	10	3,9	85	0,28	72	21	299	16	275	70	46	24	6,4	3	0,5	0,1	
18	12,7	6,8	131	0,43	63	19	300	17	501	72	35	37	9,4	1,9	0,4	0,9	
19	17,7	8,4	146	0,46	60	17	313	17	370	78	37	41	11,3	4,2	0,7	1,6	
20	17,2	7,3	166	0,52	70	22	319	13	204	80	40	40	12,9	2,9	0,5	0,9	
21	18,7	6,9	145	0,47	68	20	306	14	245	82	40	42	12,7	3,6	0,7	1,7	
22	<b>5</b>	4,9	111	0,37	75	22	298	15	<b>24</b>	78	40	38	4,3	<b>0,5</b>	0,1	0,2	
23	19,2	8,1	183	0,59	73	22	306	14	169	84	38	46	10,4	5,8	1,2	1,9	
24	<b>4,8</b>	4,3	95	0,3	70	21	308	14	81	78	27	51	3,9	<b>0,3</b>	0,1	0,4	
25	14,8	6,7	145	0,45	67	21	320	13	200	66	35	31	10,7	3,4	0,4	0,3	
26	<b>26,8</b>	4,6	104	0,33	71	22	312	13	458	84	38	46	<b>23,9</b>	1,1	1,1	0,8	
27	13,6	6,3	146	0,45	72	22	319	13	132	76	34	42	8	4,1	0,7	0,8	
28	13,7	5,8	132	0,4	69	22	325	14	201	68	38	30	9,6	3,3	0,4	0,4	
29	15,1	6,7	148	0,45	68	22	323	13	201	76	31	45	9,2	4,5	0,9	0,5	
30	18,5	6,4	147	0,45	69	22	326	14	210	74	38	36	12,6	4,3	0,9	0,7	
31	8,3	<b>3,1</b>	69	0,22	69	21	313	13	165	78	40	38	5,5	2,2	0,3	0,2	
32	10,7	6,1	135	0,42	69	22	321	14	247	68	33	35	7,2	2,7	0,4	0,4	
33	13,5	6	139	0,43	70	22	322	14	210	83	28	55	8	4,6	0,5	0,4	
34	17,4	6,6	151	0,46	70	22	323	14	201	80	32	48	12	4,2	0,5	0,7	
35	10	3,9	93	0,27	70	23	333	14	239	88	36	52	8,2	1,2	0,3	0,3	
36	<b>26,3</b>	4,2	92	0,29	68	21	313	15	142	78	28	50	14,2	10,3	1,3	0,5	
37	16	5,7	102	0,31	60	17	319	18	850	80	53	27	12,8	2,6	0,5	0,2	
38	8,6	5	115	0,36	71	22	318	14	279	74	35	39	7	1	0,3	0,3	
39	12,9	6,3	135	0,42	67	21	318	14	205	80	35	45	8,1	3,6	0,6	0,6	
40	15,2	7,1	160	0,47	67	22	335	12	206	74	40	34	11,1	2,9	0,6	0,6	
41	19,8	<b>3</b>	73	0,21	70	23	334	12	379	82	42	40	16	2,2	0,8	0,8	
42	7,7	4,6	103	0,31	68	21	322	13	<b>117</b>	78	34	44	5,4	1,4	0,2	0,7	
43	20,3	9,5	216	0,64	67	22	335	14	<b>134</b>	80	35	45	11	7,7	0,6	1	
44	<b>3,5</b>	5,4	116	0,37	68	21	311	14	<b>100</b>	90	41	49	<b>2,1</b>	1,2	0,1	0	
45	13,4	6,8	152	0,46	68	22	327	14	<b>200</b>	72	41	31	10,3	2,1	0,4	0,5	
46	10	7,4	161	0,47	63	21	338	14	<b>174</b>	88	31	57	6,3	3,1	0,2	0,4	
47	11,5	7,1	162	0,48	68	22	331	13	<b>200</b>	80	39	41	7,7	3,2	0,2	0,3	
48	15	8,2	185	0,58	70	22	317	14	<b>283</b>	84	31	53	9,3	4,4	0,8	0,6	
49	13,4	6,7	159	0,45	68	23	346	13	245	86	51	35	8,6	4	0,5	0,3	
50	4,1	3,9	81	0,27	68	20	298	15	<b>111</b>	78	33	45	<b>2,9</b>	1	0,2		

## **Anexo L. Protocolos de tinción usados para los extendidos sanguíneos.**

### **Protocolo de tinción de Giemsa**

- Debe fijarse con metanol durante 1 minuto
- Se sumerge en la tinción de Giemsa durante 40 minutos
- Se lava con abundante agua
- Se deja secar

### **Protocolo de tinción de Diff Quick**

- Se sumerge el portaobjetos en la solución fijadora durante 20 segundos
- Se sumerge en la tinción 1 (xantínicos, colorante acidófilo) durante 20 segundos
- Se sumerge en la tinción 2 (tiazínicos, colorante basófilo) durante 20 segundos
- Se lava con abundante agua
- Se deja secar

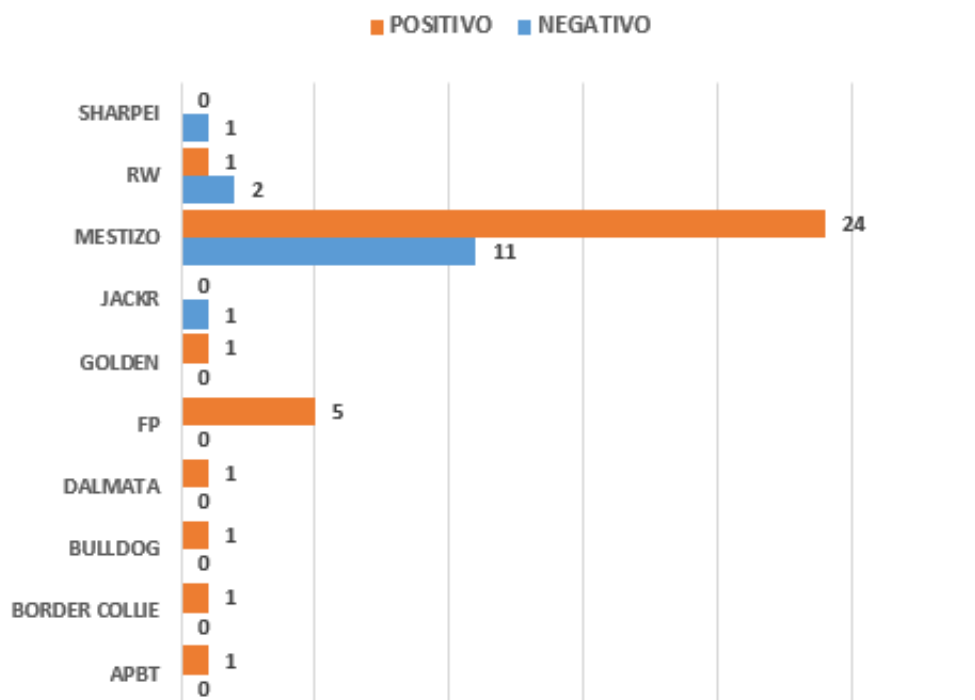
## Anexo M. análisis de frecuencia realizado a los resultados SNAP con respecto a la raza, edad y sexo

### Análisis de frecuencias

Frecuencia Snap-Raza.

		SNAP				
		TOTAL	NEGATIVO		POSITIVO	
		Recuento	Recuento	% del N válido de fila	Recuento	% del N válido de fila
RAZA	APBT	1	0	0,0%	1	100,0%
	BORDER COLLIE	1	0	0,0%	1	100,0%
	BULLDOG	1	0	0,0%	1	100,0%
	DALMATA	1	0	0,0%	1	100,0%
	FP	5	0	0,0%	5	100,0%
	GOLDEN	1	0	0,0%	1	100,0%
	JACKR	1	1	100,0%	0	0,0%
	MESTIZO	35	11	31,4%	24	68,6%
	RW	3	2	66,7%	1	33,3%
	SHARPEI	1	1	100,0%	0	0,0%

Frecuencia Snap- Raza.

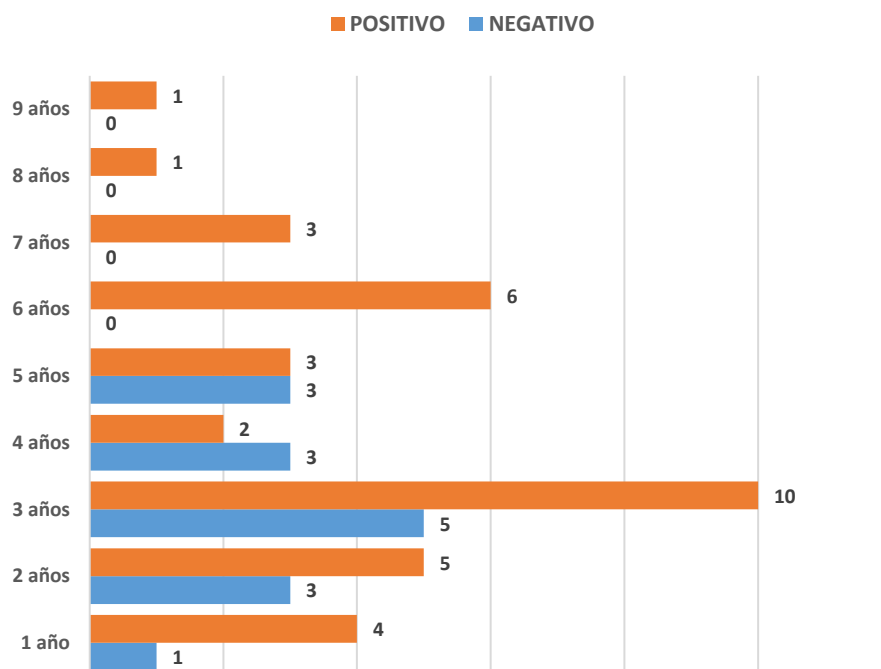




## Frecuencia Snap-Edad

	SNAP				
	TOTAL	NEGATIVO		POSITIVO	
	Recuento	Recuento	% del N válido de fila	Recuento	% del N válido de fila
EDAD 1 año	5	1	20,0%	4	80,0%
2 años	8	3	37,5%	5	62,5%
3 años	15	5	33,3%	10	66,7%
4 años	5	3	60,0%	2	40,0%
5 años	6	3	50,0%	3	50,0%
6 años	6	0	0,0%	6	100,0%
7 años	3	0	0,0%	3	100,0%
8 años	1	0	0,0%	1	100,0%
9 años	1	0	0,0%	1	100,0%

## Frecuencia Snap-Edad.

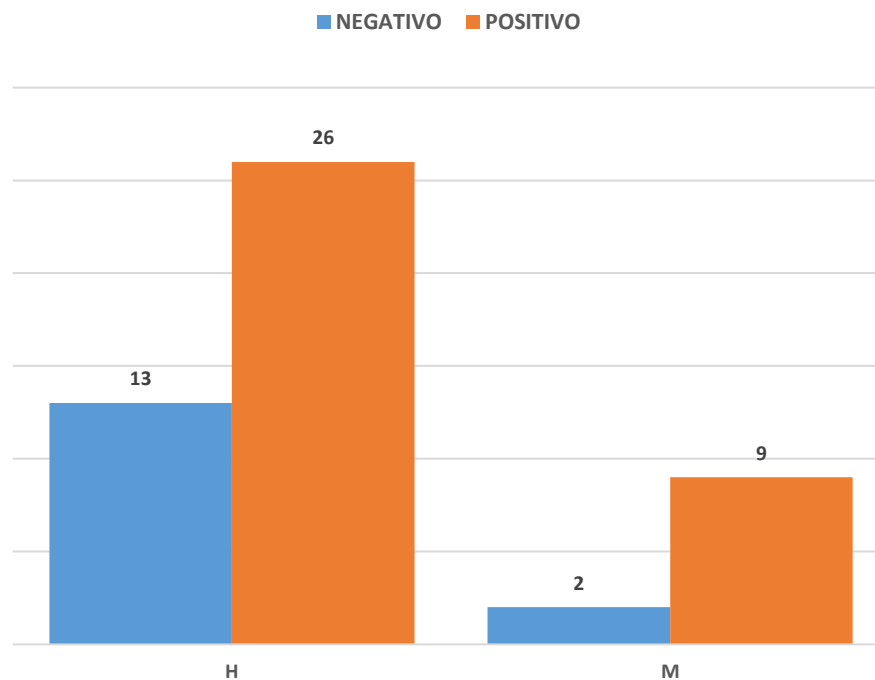


### Frecuencia de prueba Snap-Sexo.

Se puede observar en la siguiente tabla que del 100% (11) de perros machos la mayoría tuvieron resultados positivos 81,8% (9), y 18,2% (2) tuvo resultados negativos. Y del 100% de las hembras (39) el 67,7% (26) caninos fueron positivos en la prueba y el 33,3% (13) fueron negativos.

		SNAP				
		TOTAL	NEGATIVO		POSITIVO	
		Recuento	Recuento	% del N válido de fila	Recuento	% del N válido de fila
SEXO	H	39	13	33,3%	26	66,7%
	M	11	2	18,2%	9	81,8%

Frecuencia snap-sexo.



Frecuencia Snap-Sexo.

## Anexo N. Evidencias de los resultados de PCR

RESULTADOS BIOLÓGIA MOLECULAR - Rickettsiales				
No. REGISTRO CORPAVET CM-16-(794-843 y 852-876)	FECHA: 27/10/2016	HISTORIA CLÍNICA NR	NOMBRE DEL PACIENTE Tesis -Rickettsiales	
ESPECIE Canino	RAZA: Varias Razas	SEXO H y M	EDAD NR	PESO NR
FECHA DE NACIMIENTO NR	PROPIETARIO		PROCEDECENCIA NR	
REMITENTE Isabel Ricardo	TELÉFONO/FAX 3168279553	CORREO ELECTRÓNICO isaicop@gmail.com		

### Muestras remitidas

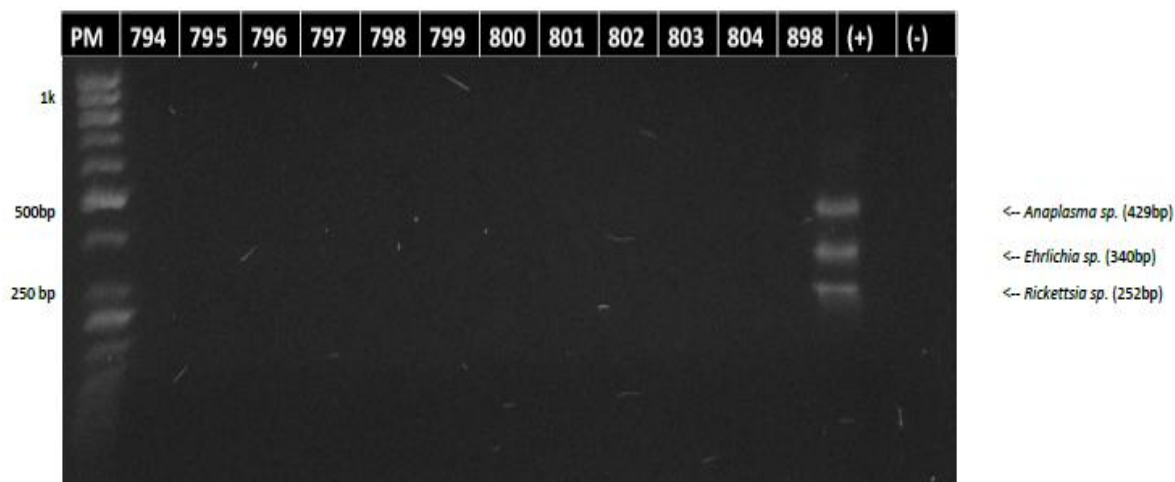
SANGRE  SUERO  LCR  HISOPO NASAL   
 Tubo EDTA Tubo seco Tubo seco Tubo seco  
 TEJIDOS  MATERIA FECAL   
 Cual: \_\_\_\_\_ Recipiente convencional

### HISTORIA

50 Muestras de Sangre y 25 muestras de garrapatas para la detección de agentes Rickettsiales en las muestras remitidas.

### RESULTADO BIOLÓGIA MOLECULAR

NEGATIVO para detección del DNA de agentes Rickettsiales evaluados en las 75 muestras remitidas- Sangre y Garrapatas.



Técnica utilizada: PCR, Accupower Rickettsiales 3-plex PCR kit. BIONEER.

PM: Patrón de peso molecular

794-843: Sangre CM-16-794-843

852-876: Garrapatas CM-16-852-876

POS: Control positivo

NEG: Control negativo

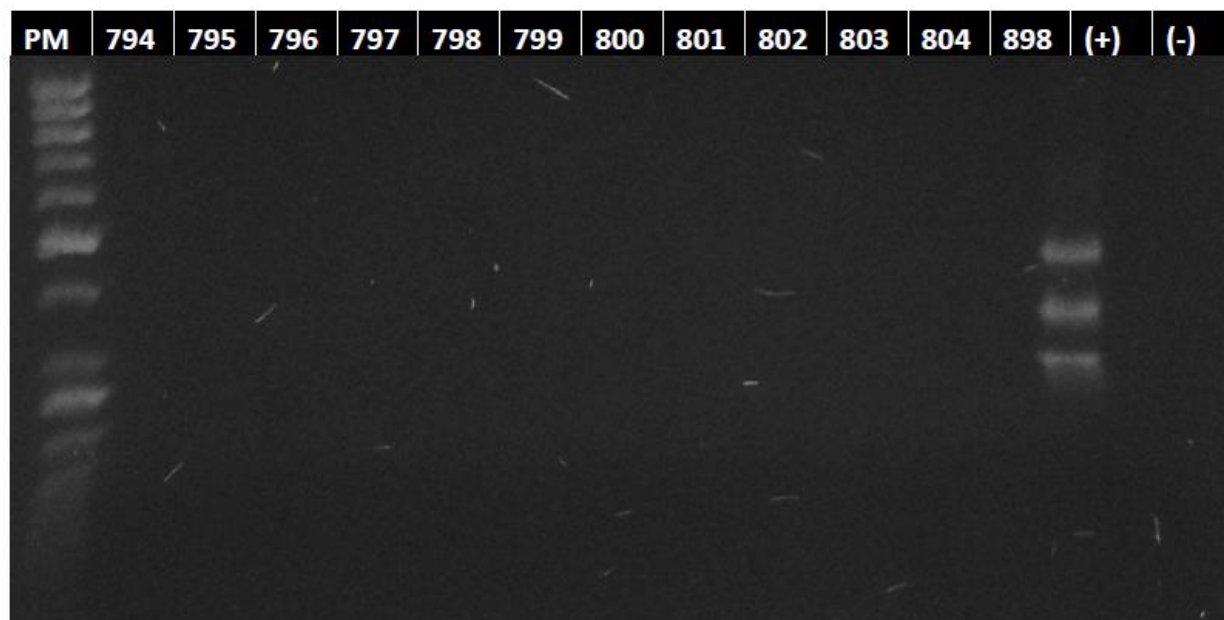
ALCANCE: Este resultado solo aplica a la muestra recibida en el laboratorio

*Paola Barato*

PAOLA BARATO  
Directora Científica  
Celular 3158195991

Fecha de registro: 10/10/16	Transcribe: MM	Fecha envío a Dx molecular: 10/26/16	Fecha envío Dir Científica: 27/10/2016
--------------------------------	-------------------	---	---

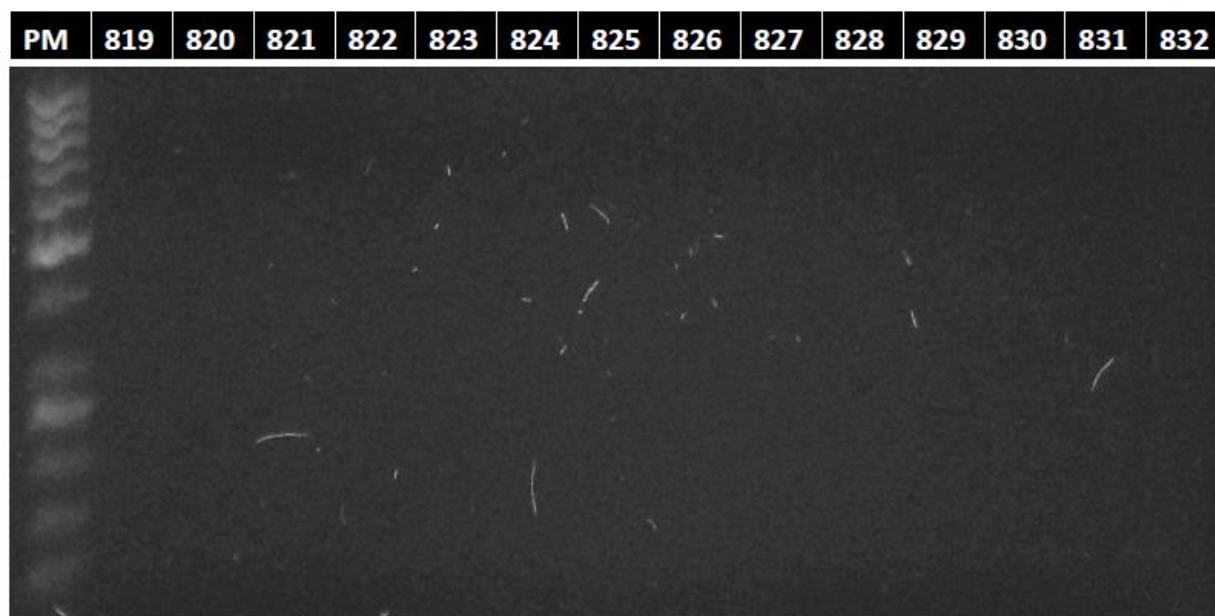
## PCR Rickettsiales (foto 1)



## PCR Rickettsiales (foto 2)



## PCR Rickettsiales (foto 3)



## PCR Rickettsiales (foto 4)

