



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Maestría en Medicina Canina y Felina

Comparación de la eficacia terapéutica con Tetraciclina (Doxiciclina) y Diamidina (Dipropionato de Imidocarb) contra *Ehrlichia canis* en perros (*Canis lupus familiaris*)

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Medicina Canina y Felina

Autor:

M.V.Z. Marco Vinicio Flores Blacio

CI: 070466153-7

Correo electrónico:

y-a-y-i@hotmail.com

Directora:

MVZ, DCVs Ana Elizabeth Guerrero López

CI: 0702509050

Cuenca - Ecuador

14 de febrero de 2022



RESUMEN.

Ehrlichia canis (*E. canis*) es una Rickettsia responsable de ehrlichiosis canina, la que es producida por la picadura de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, afectando a células mononucleares y llegando a otros órganos, en donde se multiplican. Su tratamiento es complejo y prolongado, utilizando antibióticos como la Tetraciclina (Doxiciclina) o Diamidina (Dipropionato de Imidocarb) por 28 días. Se planteó como objetivo comparar la eficacia terapéutica a los 30, 45 y 60 días post-tratamiento con Tetraciclina (Doxiciclina) y Diamidina (Dipropionato de Imidocarb) contra *E. canis* en 40 perros (*Canis lupus familiaris*), divididos en 2 grupos con 20 perros para cada uno, siendo el primero tratado únicamente con Doxiciclina (10 mg/Kg/diario) y el segundo con Doxiciclina (10 mg/Kg/diario) + Dipropionato de Imidocarb (6.67 mg/Kg) aplicándose 2 dosis con 15 días de intervalo. Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva, se obtuvo una relación estadística no significativa ($p > 0,05$) al comparar ambos tratamientos; pero ambos planes terapéuticos fueron efectivos para eliminar este microorganismo en los perros analizados, siendo un único paciente (3%) el que aun después de 30 días de tratamiento continuó siendo positivo a la prueba, el cual pertenece al primer grupo (Doxiciclina). En conclusión, los 2 tratamientos son altamente eficaces para contrarrestar la infección sistémica provocada por *Ehrlichia canis*, pero para pretender garantizar este hecho, es recomendable utilizar éstos tratamientos simultáneamente.

Palabras claves: Ehrlichia. *Canis lupus familiaris*. Resistencia a Doxiciclina. Dipropionato de Imidocarb.



ABSTRACT

Ehrlichia canis (*E. canis*) is a Rickettsia responsible for canine ehrlichiosis, which is caused by the bite of the *Rhipicephalus sanguineus* tick, affecting mononuclear cells and reaching other organs, where they multiply. Its treatment is complex and prolonged, using antibiotics (Doxycycline) or Diamidine (Imidocarb Dipropionate) for 28 days, but most of the time it is not fulfilled. The objective was to compare the therapeutic efficacy of Tetracycline (Doxycycline) and Diamidine (Imidocarb Dipropionate) against *E. canis* at 30, 45 and 60 days post-treatment in 40 dogs (*Canis lupus familiaris*), divided into 2 groups of 20 dogs for each one, being the first treated only with Doxycycline (10 mg/Kg/daily) and the second with Doxycycline (10 mg/Kg/daily) + Imidocarb Dipropionate (6.67 mg/Kg) applying 2 doses 15 days apart. The results were analyzed using descriptive statistics, a non-significant statistical relationship ($p>0.05$) was obtained when comparing both treatments. But both therapeutic plans were effective in eliminating this microorganism in the analyzed dogs, with only one patient (3%) continuing to test positive even after 30 days of treatment, which belongs to the first group (Doxycycline). In conclusion, both treatments are highly effective in counteracting systemic infection caused by *Ehrlichia canis*, but in order to guarantee this fact, it is advisable to use both treatments simultaneously.

Keywords: Ehrlichia. *Canis lupus familiaris*. Doxycycline resistance. Imidocarb Dipropionate.



INDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN..... | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| INDICE..... | 4 |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 1.1. Objetivos:..... | 9 |
| 1.1.1. Objetivo general..... | 9 |
| 1.1.2. Objetivos específicos..... | 9 |
| CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 10 |
| 2.1. Ehrlichiosis monocítica canina..... | 10 |
| 2.2. Presentación de la enfermedad..... | 10 |
| 2.2.1. Presentación aguda: | 10 |
| 2.2.2. Presentación subclínica:..... | 10 |
| 2.2.3. Presentación crónica:..... | 11 |
| 2.3. Estudios anatomopatológicos..... | 11 |
| 2.4. Diagnóstico..... | 12 |
| 2.4.1. Visualización microscópica..... | 12 |
| 2.4.2. Métodos moleculares..... | 12 |
| 2.4.3. Cultivo..... | 13 |
| 2.4.4. Serología..... | 13 |
| 2.5. Tratamiento..... | 14 |
| 2.6. Prevención..... | 15 |
| 2.7. Mecanismos de resistencia de las bacterias a las tetraciclinas..... | 15 |
| 2.7.1. Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico..... | 15 |
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 3.1. Materiales..... | 16 |
| 3.1.1. Localización..... | 16 |
| 3.1.2. Población y muestra..... | 16 |
| 3.1.3. Diseño Experimental..... | 17 |
| 3.1.4. Tipo de estudio..... | 17 |
| 3.1.5. Variables..... | 17 |
| 3.2. Metodología para la investigación..... | 18 |
| 3.2.1. Primera consulta..... | 18 |
| 3.2.2. Diagnóstico inicial..... | 18 |
| 3.2.3. Diagnóstico por PCR..... | 18 |



| | |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4. Seguimiento de los pacientes durante el estudio..... | 19 |
| 3.2.5. Estadística..... | 19 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS..... | 20 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN | 22 |
| CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 25 |
| 6.1. Conclusiones | 25 |
| 6.2. Recomendaciones..... | 25 |
| REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 26 |
| ANEXOS | 33 |



Cláusula de Propiedad Intelectual

Marco Vinicio Flores Blacio, autor/a del trabajo de titulación "Comparación de la eficacia terapéutica con Tetraciclina (Doxiciclina) y Diamidina (Dipropionato de Imidocarb) contra *Ehrlichia canis* en perros (*Canis lupus familiaris*)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 14 de febrero de 2022.

Marco Vinicio Flores Blacio

C.I: 070466153-7



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Marco Vinicio Flores Blacio en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Comparación de la eficacia terapéutica con Tetraciclina (Doxiciclina) y Diamidina (Dipropionato de Imidocarb) contra *Ehrlichia canis* en perros (*Canis lupus familiaris*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 14 de febrero de 2022.

Marco Vinicio Flores Blacio

C.I: 070466153-7



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.

La ehrlichiosis canina es una enfermedad ampliamente distribuida en zonas tropicales provocada por una Rickettsia (*E. canis*); cuyo vector de transmisión es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, (Goulart *et al.*, 2018; Jimenez *et al.*, 2017). Este microorganismo se disemina vía sanguínea o linfática dentro de las células mononucleares infectadas, llegando a otros órganos como el bazo, hígado, médula ósea, etc. donde se multiplican. Gutierrez *et al.* (2016) y Nelson y Couto (2010) mencionan que es necesario un tratamiento de 28 días con Doxiciclina (10 mg/kg cada 24h), pero Harrus *et al.* (1998) sugieren que incluso 42 días de tratamiento pueden no ser suficientes para controlar a *E. canis* de todos los perros con infección subclínica. La mayoría de los dueños usualmente no completan ni el primer tratamiento mencionado, provocando que no se controle la Rickettsia, pudiendo existir recaídas de las mascotas (Mcclure *et al.*, 2010); otro fármaco que también se utiliza para controlar esta Rickettsia es el Dipropionato de Imidocarb (5-7mg/kg cada 15 días) (Sainz *et al.*, 2000).

De acuerdo a Valero (2016) los que agravan esta situación son los médicos veterinarios, quienes llegan a realizar planes terapéuticos inadecuados lo que puede originar que se seleccionen cepas resistentes de este microorganismo a los fármacos que generalmente se usan para controlarla. Por otro lado se ha demostrado que las Rickettsias pueden defenderse de la acción de las tetraciclinas (Doxiciclina) principalmente mediante tres mecanismos: eflujo activo, protección ribosomal y la inactivación enzimática, los cuales a su vez están codificados por diferentes genes (Jara, 2007).

Otra particularidad a tomar en cuenta son las diferentes mutaciones que pueden surgir en estos microorganismos que los pueden hacer más resistentes al efecto bacteriostático de la Doxiciclina (Kondethimmanahalli & Ganta, 2018), pero éstos atributos no han sido determinados o identificados en *E. canis* por lo que no se ha establecido si ya ha adquirido algún punto de resistencia a la acción de la Doxiciclina o al Dipropionato de Imidocarb, especialmente en mascotas que ya han sido tratadas anteriormente con estos fármacos. Por todas las razones antes mencionadas es de suma importancia identificar si la Doxiciclina y el



Dipropionato de Imidocarb son utilizados en plan terapéutico adecuado para eliminar definitivamente esta *Rickettsia*, caso contrario se evidenciaría una posible mala instauración del tratamiento para esta enfermedad o la aparición de una factible selección natural de *Rickettsias* resistentes a Doxiciclina o al Dipropionato de Imidocarb, principalmente en los pacientes tratados durante la fase crónica de la enfermedad (Jimenez *et al.*, 2017).

1.1. Objetivos:

1.1.1. Objetivo general.

Comparar la eficacia terapéutica de la Doxiciclina sola o con Dipropionato de Imidocarb contra la infección sanguínea *E. canis* en perros (*Canis lupus familiaris*) a los 30, 45 y 60 días post-tratamiento.

1.1.2. Objetivos específicos.

- ✓ Identificar por método serológico (Kit CaniV-4) la exposición de perros a *E. canis* que llegan a la clínica veterinaria Animal House de la ciudad de Machala.
- ✓ Detectar mediante un método molecular (PCR) la infección por *E. canis* en perros que dieron positivo a la prueba serológica en la clínica veterinaria Animal House de la ciudad de Machala.
- ✓ Determinar la presencia de *E. canis* en sangre de perro a los 30, 45 y 60 días post-tratamiento únicamente con Doxiciclina y con Doxiciclina más Dipropionato de Imidocarb.
- ✓ Comparar mediante PCR la eficacia terapéutica contra *E. canis* en perros que llegan a la clínica veterinaria Animal House de la ciudad de Machala, a los 30, 45 y 60 días posteriores al tratamiento con Doxiciclina sola y con Dipropionato de Imidocarb.



CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Ehrlichiosis monocítica canina.

La ehrlichiosis tiene como agente etiológico a un microorganismo perteneciente al subgrupo α -Proteobacteria, orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, género Ehrlichia, la cual es una bacteria intracelular obligada, Gram negativa, que se transmite a perros domésticos y otros miembros de la familia Canidae en regiones tropicales y subtropicales del planeta principalmente, esto en concordancia con la presencia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Gutierrez *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2018).

Este agente patógeno se distribuye a través de la vía sanguínea o linfática infectando linfocitos y monocitos pasando por tres estadios: cuerpos elementales, cuerpos iniciales y mórulas; siendo esta última con la que se llega a diagnosticar en el frotis sanguíneo (Gutierrez *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2018).

2.2. Presentación de la enfermedad.

2.2.1. Presentación aguda:

La fase aguda inicia luego de un periodo de incubación de 1 a 3 semanas y dura de 15 a 30 días, presentando signos muy evidentes como fiebre que sobrepasa los 40°C, apatía, debilidad, presencia de estornudos, mucosidad nasal, claudicación o parálisis del tren posterior, linfadenomegalia, alteraciones en la coagulación sanguínea; esto último genera petequias y equimosis en la piel y membranas mucosas, en casos más graves puede existir epistaxis. En los exámenes de laboratorio se evidencia trombocitopenia, leucopenia y principalmente anemia (Jimenez *et al.*, 2017; McClure *et al.*, 2010).

2.2.2. Presentación subclínica:

La fase subclínica puede llegar a durar meses o años; en esta fase los perros relativamente se recuperan llegando a controlar o eliminar a *E. canis* del cuerpo dependiendo de que tan competente esté su sistema inmunológico, pero en la



gran mayoría de los perros afectados la infección persiste instaurándose así la fase crónica (Goulart *et al.*, 2018; Jimenez *et al.*, 2017).

2.2.3. Presentación crónica:

Esta fase de la enfermedad puede llegar a durar años, presentando una respuesta pobre al tratamiento (Ramakant *et al.*, 2020) y con signos clínicos sutiles e inespecíficos que pueden llegar a signos muy graves debido a la exagerada respuesta inmunológica del hospedero al tratar de defenderse llegando a presentar:

- a) Trombocitopenia por consumo o destrucción inmunomediada, secuestro o disminución de la producción, que llega a una pancitopenia por aplasia medular.
- b) Hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía generalizada.
- c) Edema intersticial o alveolar, hemorragia parenquimatosa pulmonar, lo cual conduce a disnea o tos.
- d) Manifestaciones oftálmicas: vasos retinianos tortuosos, infiltrados perivasculares retinianos, hemorragia retiniana, uveítis anterior y desprendimiento exudativo de retina.
- e) Manifestaciones nerviosas: depresión, dolor, ataxia, paresia, nistagmo y convulsiones (Carrion, 2016; Gutierrez *et al.*, 2016; Jimenez *et al.*, 2017).

2.3. Estudios anatomopatológicos.

La principal afección anatomopatológica hallada por Freire, *et al.* (2017); López, (2018); Rodriguez, *et al.* (2008) y Saito, *et al.* (2015) es la gran infiltración plasmocítica-linfocítica, la cual provoca en la mayoría de los órganos un aumento de su tamaño, por lo que se evidencia hepatomegalia con necrosis centrolobulillar, degeneración y apoptosis de los hepatocitos; esplenomegalia e hiperemia y en casos más graves incluso hasta se han generado hematomas y tumores; en los pulmones se presentan microgranulomas e infiltrados perivasculares de macrófagos y linfocitos en los tabiques interalveolares; por



último el riñón presenta glomerulonefritis membranoproliferativa y proliferativa .

2.4. Diagnóstico.

La diagnosis de ehrlichiosis canina está basada en una complementación de diferentes aristas como son los hallazgos clínicos, a más de alteraciones hemodinámicas, por observación de mórulas de *E. canis* dentro de monocitos y/o linfocitos, pruebas de serología (anticuerpo fluorescente indirecto-IFA, ELISA), detección de su ADN en tejidos diana mediante amplificación por PCR o el cultivo in vitro (Gutierrez *et al.*, 2016; M. E. Mylonakis *et al.*, 2003).

2.4.1. Visualización microscópica.

E. canis puede ser observada al microscopio en células sanguíneas principalmente linfocitos y monocitos como una inclusión granular basófila bajo una tinción tipo Romanowski (Diff-Quik); siendo los primeros los sitios en donde se los encuentra con mayor facilidad debido a que se encuentran en mayor cantidad que los segundos. Se pueden encontrar en sangre periférica, médula ósea, aspirados de tejidos y líquidos cefalorraquídeo, pero su búsqueda es dificultosa y consume tiempo ya que las morulas pueden confundirse con plaquetas superpuestas a los monocitos (Gutierrez *et al.*, 2016; Jimenez *et al.*, 2017; M. E. Mylonakis *et al.*, 2003).

2.4.2. Métodos moleculares.

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se utiliza para confirmar la infección activa con *Ehrlichia spp.* frente a otros métodos de diagnóstico ya que ha demostrado ser un método mucho más sensible, detectando la infección en etapas agudas incluso antes de que el organismo genere anticuerpos en contra del antígeno. El principal gen a identificar es el 16S ARNr de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo u nódulos linfáticos; a pesar de que este sea el mejor método diagnóstico existente hasta el momento los requerimientos que necesitan y los costos son muy elevados lo que limita su uso en la práctica diaria (Almazán *et al.*, 2016; Gutierrez *et al.*, 2016; M. E. Mylonakis *et al.*, 2003).



Previo a la Identificación del genoma de *Ehrlichia canis* mediante PCR, se debe realizar la extracción del ácido desoxirribonucleico ADN presente en la muestra de sangre, procedimiento efectuado mediante el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini que comprende varias etapas descritas en el anexo 3 (QIAGEN, 2012).

2.4.3. Cultivo.

Debido a que *E. canis* es un microorganismo obligatoriamente intracitoplasmático resulta muy difícil y costoso su cultivo por lo que no es muy utilizado en la clínica diaria. Además su aislamiento se consigue después de 8 semanas, por ende, básicamente se lo utiliza con propósitos investigativos (Gutierrez *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.4.4. Serología.

Las pruebas serológicas son las herramientas diagnósticas más utilizadas en la práctica diaria gracias a su fácil aplicación y a la obtención de resultados relativamente fiables, que si bien no superan a las técnicas moleculares, son de gran ayuda y de fácil acceso tanto para los médicos veterinarios como para su autorización por parte del propietario, entre estas técnicas tenemos a la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Gutierrez *et al.*, 2016; Movilla *et al.*, 2016).

La sensibilidad de estas pruebas va a depender del estadio de la enfermedad cuando ésta es analizada, teniendo valores de entre el 82 al 100%; por el contrario, la especificidad va desde el 67 al 100% por la reactividad cruzada que se genera al existir especies similares que pueden estar infectando al mismo tiempo a un mismo individuo (Chandrashekar *et al.*, 2010; Zetina *et al.*, 2019).

Tabla 1. Pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de ehrlichiosis

| Prueba | Sensibilidad | Especificidad | Antígeno | Formato |
|-------------|--------------|---------------|----------------------------|---------|
| rMAP2-ELISA | 71% | 85% | Proteína recombinante MAP2 | ELISA |



| | | | | |
|----------------------------------|---------|---------|-------------------------------|---------------------|
| Immunocom p[®] | 86% | 98% | Microorganismo | dot-ELISA |
| SNAP 3Dx[®] | 71% | 100% | Péptido sintético p30 y p30-1 | dot-ELISA |
| SNAP 4Dx[®] Plus | 97.8% | 92.3% | Péptido sintético p30 y p30-1 | dot-ELISA |
| IFI | 82-100% | 67-100% | Células DH82 infectadas | inmunofluorescencia |

Fuente: modificado de Zetina *et al.* (2019).

El kit de prueba Anigen Rapid CaniV-4[®] es un ensayo de inmunocromatografía que detecta antígeno de *Dirofilaria immitis*, anticuerpos de *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma phagocytophilum/Anaplasma platys* en suero canino, plasma o sangre total, esta prueba rápida tiene una sensibilidad el 97.6% y una especificidad de 99% para *E. canis* (BioNote, 2016).

2.5. Tratamiento.

El fármaco mayormente utilizado para tratar la ehrlichiosis es la Doxiciclina a una dosis de 5-10 mg/kg cada 12 o 24 horas vía oral durante 28 días, obteniendo una respuesta favorable a la enfermedad en su fase aguda; en el caso de la presentación crónica la respuesta al tratamiento es débil (Fourie *et al.*, 2015; Jimenez *et al.*, 2017).

La Doxiciclina ingresa a los microorganismos y en su interior se unen a la subunidad ribosomal 30s y posiblemente a las subunidades ribosómicas 50-S, de esta forma bloquean la unión del ácido ribonucleico de transferencia de aminoácido (tRNA) al ácido ribonucleico mensajero (mRNA), impidiendo la síntesis proteica (Fourie *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2020; Sumano & Ocampo, 2006).

Otro medicamento utilizado para controlar *E. canis* es el Dipropionato de Imidocarb, una dosis de 6mg por kilo cada 15 días, su acción se basa en la alteración morfológica y funcional del núcleo y citoplasma del antígeno; tras su administración se puede evidenciar signos como: salivación, vómito, diarrea por lo que se debe instaurar un tratamiento anticolinérgico, además su uso puede



generar residuos metabólicos los que afectan a hígado y riñón a largo plazo (Nitture *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2021; Sumano & Ocampo, 2006).

2.6. Prevención.

Debido a que no existe una vacuna contra esta patología el único modo de prevenirla es la eliminación y control del vector transmisor tanto del hospedero como del ambiente, para lo cual se pueden utilizar una serie de ectoparasiticidas, entre las que destacan las isoxazolinas (Afoxolaner, Fluralaner o Sarolaner) o fenilpirazoles (fipronil); otra medida es la de fumigar el ambiente y lugares aledaños en donde habitan los perros con formamidinas (amitraz) o piretroides (cipermetrina), (Dantas-Torres, 2008; Gutierrez *et al.*, 2016; Jongejan *et al.*, 2016)

2.7. Mecanismos de resistencia de las bacterias a las tetraciclinas.

En términos generales, la rápida propagación de la resistencia a la tetraciclina entre bacterias se debe a la localización de genes tet en plásmidos, transposones e integrones. La resistencia al antibiótico es conferida por uno o más de los 39 genes tet descritos actualmente, que codifican uno de los tres mecanismos de resistencia (Jara, 2007).

2.7.1. Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico.

Las proteínas de transporte que rigen el diseño de eflujo esta codificado por los genes tet A, tet B, tet C, tet D y tet G, siendo los genes tet A y tet B los descritos con mayor frecuencia en las bacterias Gram negativas, lo que le confiere el mecanismo de resistencia a los medicamentos (Balassiano *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2007; Jara, 2007; Olowe *et al.*, 2013).



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales.

Materiales de oficina: hojas de registro, esferos, computadora, cámara digital

Materiales de laboratorio: mandil, jeringas, puntas de micropipetas, portaobjetos, cubreobjetos, torniquete, algodón, alcohol, tubos para muestra sanguínea, tubos de PCR, aceite de inmersión, kit CaniV-4, Tinción Diff Quick, Tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA), agujas 21 x 1 ½, viales autoclavables, guantes de látex, tips para micropipeta autoclavables de 0.5 µl, 10 µl y 100 µl, Kit de extracción de ADN (QIAGEN), master Mix para PCR, agua destilada, primers específicos (ECC, ECB, HE3, HE1), Cámara electroforética horizontal, gel de Agarosa 1,5%, soluciones Buffer (TBE), Bromuro de Etidio, parafilm

Equipos: cámara de electroforesis, potenciómetro, balanza, platina de agitación, transluminador, fotodocumentador, termociclador, centrífuga, congeladora, fuentes de poder, transiluminador UV.

3.1.1. Localización.

El estudio se realizó en la ciudad de Machala, capital de la provincia de El Oro situada en las tierras bajas próximas al golfo de Guayaquil en el océano Pacífico, temperatura promedio variable de 18° a 34°C., altitud media 6 msnm., específicamente en la clínica veterinaria Animal House (Romero, 2014)

3.1.2. Población y muestra.

La población para este estudio fue de 40 perros que llegaron a la Clínica Veterinaria Animal House presentando signos clínicos referentes a ehrlichiosis canina, sin distinción de peso, sexo, edad y raza, en un periodo de 4 meses. Estos pacientes fueron divididos al azar y equitativamente en 2 grupos de 20 perros cada uno.



3.1.3. Diseño Experimental.

Se evaluaron pacientes positivos a ehrlichiosis canina, 40 perros en total, divididos en 2 grupos con 20 pacientes por cada uno.

- **Evaluación de Grupo 1 Doxiciclina:** se evaluó mediante prueba PCR pacientes que fueron tratados con Doxiciclina, dosis de 10 mg / Kg / diario, a los 30, 45 y 60 días.
- **Evaluación de Grupo 2 Doxiciclina + Dipropionato de Imidocard:** se evaluó mediante prueba PCR a los 30, 45 y 60 días, pacientes que fueron tratados con Doxiciclina, dosis de 10 mg / Kg / diario + Dipropionato de Imidocarb 6.67 mg/ Kg/, luego de 8 días de iniciado el tratamiento con Doxiciclina y se repitió la dosis en 15 días.

3.1.4. Tipo de estudio.

El estudio realizado fue de tipo básico, observacional descriptivo.

3.1.5. Variables.

Las variables en estudio están descritas en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Variables en estudio.

| Variables | Dimensiones |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Presencia o ausencia de <i>Ehrlichia canis</i> (diagnóstico) | Presencia |
| | Ausencia |
| | 30 días |
| | Presencia Ausencia |
| Presencia o ausencia de <i>Ehrlichia canis</i> | 45 días |
| | Presencia Ausencia |
| | 60 días |
| | Presencia Ausencia |

En el anexo 1 se encuentra la operacionalización de las variables.



3.2. Metodología para la investigación.

El proceso investigativo constó de las siguientes etapas:

3.2.1. Primera consulta.

Se realizó la anamnesis de los pacientes mediante una entrevista rigurosa al propietario y a los pacientes se les hizo un examen clínico general que se registró en la respectiva hoja de historia clínica (anexo 2).

3.2.2. Diagnóstico inicial.

El diagnóstico de los pacientes para la detección de la presencia de *Ehrlichia canis* fue mediante la aplicación de método serológico empleando el Kit CaniV-4 sin distinción del sexo, edad, ni raza. Para esto se obtuvo 1 ml de la sangre de la vena cefálica de los pacientes, se la colocó en un tubo vacutainer tapa lila con EDTA para realizar las pruebas serológicas. A todos los pacientes que entraron al estudio se les administró Afloxolaner (Nexgard®) para el control de garrapatas.

3.2.3. Diagnóstico por PCR.

Para la Identificación del genoma de *Ehrlichia canis* se aplicó el método molecular PCR, que consta de las siguientes etapas:

- ✓ La muestra de sangre obtenida para el diagnóstico serológico se almacenó en un congelador a -20°C para su mejor conservación, hasta ser analizada por la prueba molecular.
- ✓ Para el análisis molecular de las muestras positivas a la prueba serológica de *Ehrlichia canis* se extrajo el ADN utilizando el DNAesy Blood and tissue kit (QIAGEN®) siguiendo las especificaciones del fabricante. El kit se basa en la capacidad de retener el material genético en columnas de sílice para separarla del resto de componentes celulares.
- ✓ El ADN extraído se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (THERMO SCIENTIFIC®) a una absorbancia de 260nm. Para la PCR, se usaron los oligonucleótidos con los primers ECC Fw (5'-



AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') y ECB (5'CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'), reportados por Dawson *et al.*, (1994) que amplifican un fragmento de 500 pb dentro de la región del ADNr 16S del género *Ehrlichia*. Las condiciones usadas en la PCR convencional fueron la de tomar 0,25 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, 200 μ M de cada deoxi-nucleótido, 2 mM de MgCl₂, y 1,2 unidades de TaqPolimerasa (Fermentas®).

- ✓ Se utilizó 1 μ L de ADN extraído para completar un volumen final de reacción de 50 μ L. Posterior a una desnaturalización durante cuatro minutos a 94 °C, el programa de amplificación fue de 35 ciclos de: 94°C durante un minuto, 60 °C durante un minuto y 72 °C durante un minuto, con una extensión final de cinco minutos a 72 °C.
- ✓ Los productos obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 2% a 70V durante una hora. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50pb (Fermentas®) y se revelaron en transiluminador ultravioleta para verificar la presencia de ADN de *Ehrlichia spp.*

3.2.4. Seguimiento de los pacientes durante el estudio.

De acuerdo a los resultados por PCR de la presencia o no del genoma de *E. canis* después de iniciado el tratamiento, cuando los pacientes dieron PCR negativo a los 30 días de tratamiento, se realizó una segunda prueba confirmatoria a los 45 días, lo mismo se aplicó al obtener un resultado negativo a los 45 días realizándose una prueba confirmatoria a los 60 días.

3.2.5. Estadística.

Los datos se registraron por medio de una hoja de historia clínica según sistema de manejo ECOP (Anexo 2).

Este estudio es del tipo experimental y los análisis estadísticos fueron analizados utilizando el software SPSS. Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en estudio se usó la prueba Chi Cuadrado, considerándose como diferencia estadísticamente significativa cuando sea $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS.

Este estudio identificó la presencia de *Ehrlichia canis*, en perros diagnosticados con ehrlichiosis monocítica canina que fueron llevados a consulta a la clínica veterinaria Animal House del cantón Machala y fueron evaluados después del tratamiento de 30, 45 y 60 días con Doxiciclina sola y con Doxiciclina más Dipropionato de Imidocarb, mediante prueba de Reacción en Cadena de la Polimeraza (PCR) obteniendo los resultados expuestos en el anexo 4.

En la figura 1, se representa que de los 40 casos solo uno presentó positividad luego de los 30 días de tratamiento, representando el 3% del total de los casos.

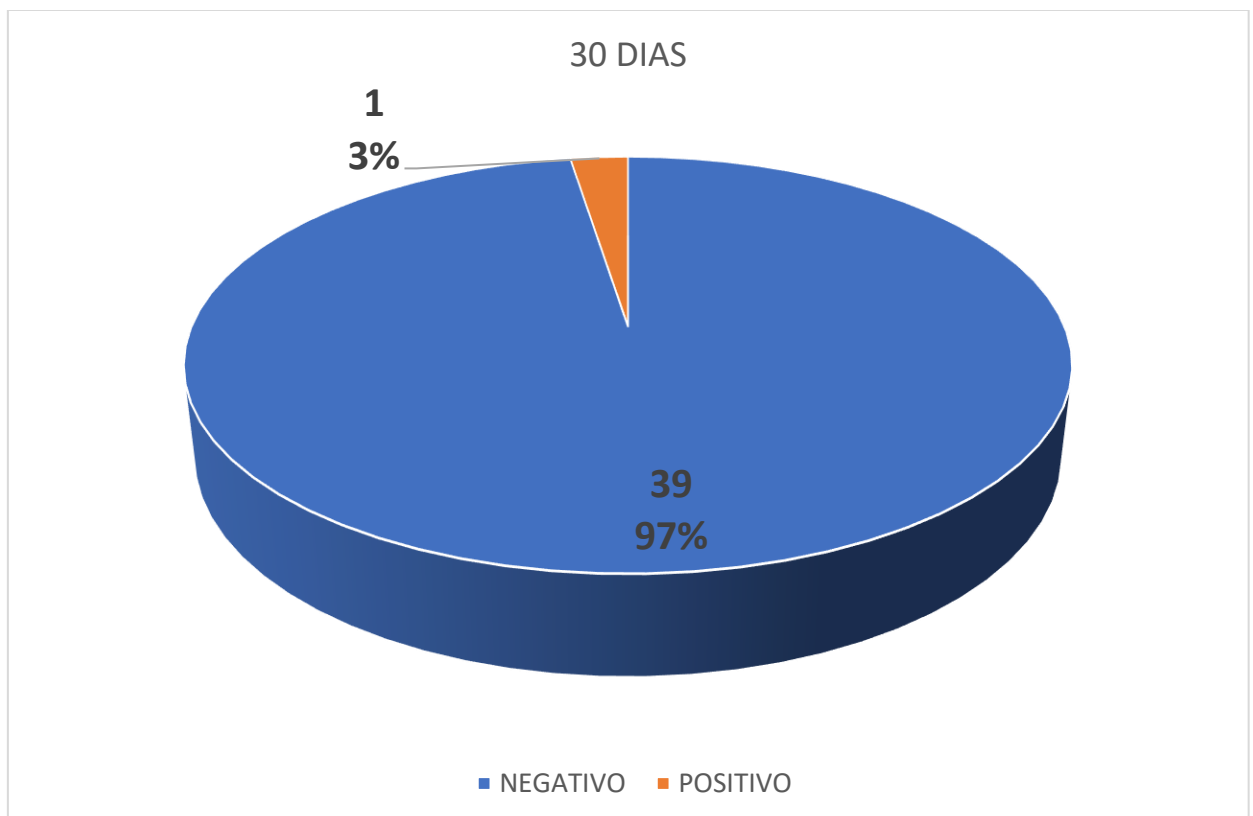


Figura 1. Representación de los resultados obtenidos de las muestras a los 30 días post tratamiento.

De los 40 casos, divididos en 20 casos por cada grupo de los tratamientos en estudio observamos que en el grupo del tratamiento único de Doxiciclina se presenta un caso positivo y 19 casos negativos, mientras que en el grupo del tratamiento de Doxiciclina más Dipropionato de Imidocarb los 20 casos en

estudio fueron negativos como se expresa en el anexo 5 y se representa en la figura 2.

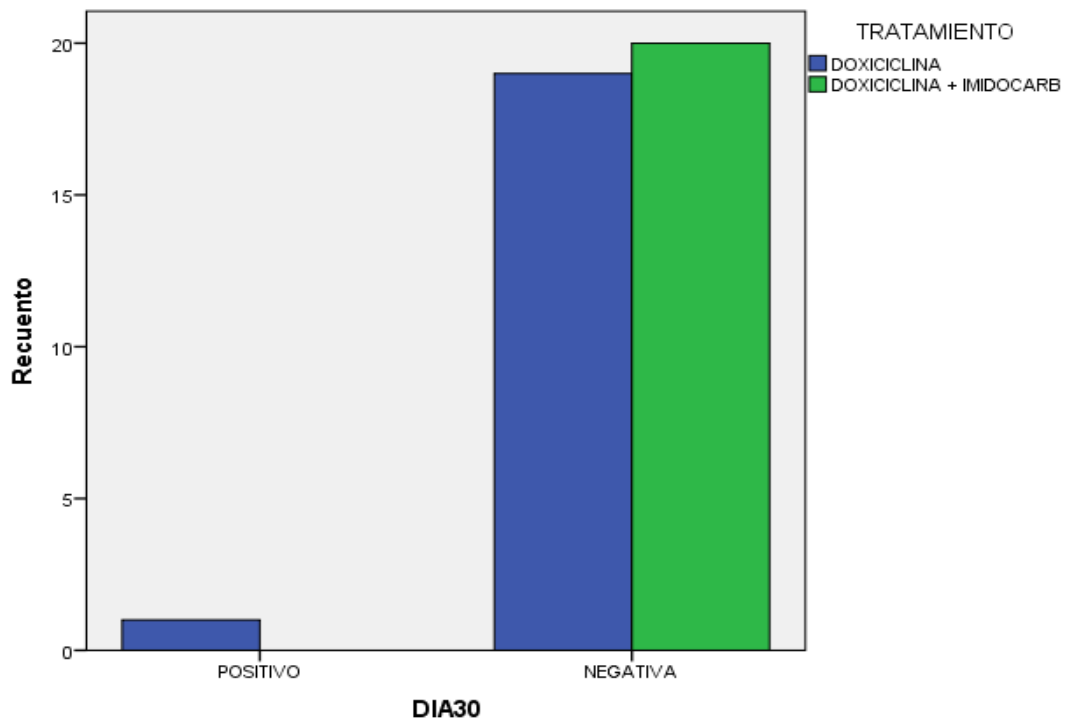


Figura 2. Comparación de los tratamientos en estudio.

Según la prueba de chi-cuadrado, los valores obtenidos son mayores a 0,05 por lo que no son estadísticamente significativos (anexo 6).



CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El análisis PCR que se realizó a 40 pacientes después de 30 días de tratamiento determinó que tan solo un paciente continuó siendo positivo a la prueba, mismo que representa el 3% de todos los casos, perteneciente al grupo de tratamiento con Doxiciclina (10mg/kg); éste hallazgo concuerda con lo expuesto por Fuerai *et al.* (2015), quien menciona que de todos los pacientes que entraron a su estudio únicamente un solo paciente recayó después del tratamiento con Doxiciclina, siendo tratado nuevamente con Doxiciclina a 10 mg/kg por vía oral durante 28 días más. Harrus *et al.* (1998); Sainz *et al.* (2000); Sousa *et al.* (2021) y Mylonakis *et al.* (2019) manifiestan que un tratamiento adecuado para la eliminación de *E. canis* del hospedero usando Doxiciclina debe de ser de mínimo 28 días, pero Harrus *et al.* (2004) afirma que únicamente es necesario dar la Doxiciclina por 16 días, ya que mediante muestras tomadas del bazo de sus individuos estudiados ya no detectó *E. canis* a partir de los 16 días de iniciado el tratamiento; sin embargo, la aparición de recrudescencia requiere un tratamiento adicional, ya sea dando el mismo antibiótico por mas días o aumentando otro medicamento como lo es el Dipropionato de Imidocarb que de acuerdo a Sainz (1996), Sainz *et al.* (2000) y Nitture *et al.* (2020) genera una mejoría clínica evidente, en la mayoría de los casos en las primeras 72 horas; con la única diferencia de que al utilizarlo como único medicamento se ha demostrado que la evolución biopatológica favorable se alcanza más lentamente.

Otro estudio a tomar en consideración es el de Harrus (1998), quien expone que los resultados de la PCR en sangre de todos sus pacientes fueron negativos a los 30 días de tratamiento; sin embargo, se encontró que la muestra de sangre de un perro resultó positiva por PCR 6 semanas después del tratamiento; en nuestro estudio no sucede lo mismo ya que nuestro paciente después de continuar el tratamiento hasta los 45 días dió un resultado PCR negativo; esta diferencia pudo haberse generado por la posibilidad de una infección cíclica durante la recuperación de ehrlichiosis monocítica canina (EMC) o también sugiere que el microorganismo puede "escondarse" en otros órganos como el bazo y la médula ósea, en base a esto Harrus (1998) propone que para próximos estudios se debería tomar muestras de 3 fuentes (sangre, bazo y medula ósea)



y determinar la fuente en donde se puede estar albergando el microorganismo para reactivarse, pero el estudio de Sato *et al.* (2020) manifiestan que a pesar de administrar glucocorticoides y ciclosporina a dosis inmunosupresoras, no se reactivó la enfermedad después de 6 meses de haber culminado el tratamiento de perros infectados experimentalmente, ya que el se basó en la posibilidad de que la enfermedad se reactive a causa de inmunosupresión por situaciones de estrés.

La fase de la enfermedad en la que está el paciente al momento del diagnóstico puede llegar a afectar su respuesta al tratamiento así como lo afirma McClure *et al.* (2010) ya que los pacientes tratados en las fases aguda y subclínica se volvieron PCR negativa para *E. canis* a medida que mejoraron los parámetros clínicos, pero las muestras de sangre extraídas de perros tratados durante la EMC crónica permanecieron intermitentemente positivas a la PCR, ya que se les tomaron muestras cada 2 semanas hasta 90 días post tratamiento y en unas muestras daban positivas y en otras negativas, lo que concuerda con lo expuesto por Ramakant *et al.* (2020), ya que según ellos la fase crónica puede presentar una respuesta pobre al tratamiento, en base a estas aseveraciones se podría sugerir que esto fue lo que sucedió con nuestro único paciente positivo después del tratamiento por 30 días, debido a que fue un perro que reincidió con la enfermedad después de aproximadamente 6 meses de haberla presentado por primera vez.

Autores como Garcia *et al.* (2018), Kledmanee *et al.* (2009), Marcondes (2016), Rotondano *et al.* (2015) y Vargas *et al.* (2012) manifiestan que la gran mayoría de pacientes presentan infecciones mixtas de microorganismos transmitidos por la garrapata tales como: *E. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *Hepatozoon spp* o *Babesia canis* por esto Carrión (2016), Nitture *et al.* (2020), Pantaleón *et al.* (2017) y Sousa *et al.* (2021) sugieren utilizar la combinación de Doxiciclina y Dipropionato de Imidocarb y así cubrir un campo más amplio de acción terapéutica y asegurándonos de que no se nos “escape” algún microorganismo no diagnosticado en los exámenes de rutina realizados al paciente y en el caso específico de *E. canis* que es el objetivo de nuestro estudio, el utilizar ambos medicamentos da una mayor seguridad de poder eliminar el



antígeno del organismo, corroborándose con el resultado obtenido de que ningún paciente del grupo 2 dió positivo después del tratamiento aplicado.

Debido a la gran facilidad que existe en las zonas tropicales para que los pacientes se reinfesten de garrapatas (Mylonakis *et al.*, 2019) y por ende reincidan en esta patología es de suma importancia llevar a cabo un programa concomitante de control de garrapatas para evitar posibles reinfecciones que implican la necesidad de instaurar nuevamente el tratamiento (Fourie *et al.*, 2015) con todos los posibles daños en los órganos que esto conlleva, además de acuerdo a Cabrera *et al.* (2007), el usar un antibiótico por un largo tiempo ejerce una permanente presión de selección sobre la microbiota intestinal y con ello un riesgo muy importante para la presentación del fenómeno de resistencia bacteriana.



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Los tratamientos (Doxiciclina y Doxiciclina más Dipropionato de Imidocarb) puestos en comparación por este estudio han demostrado ser estadísticamente iguales en cuanto a su eficacia terapéutica contra *E. canis*, con la ventaja de que el segundo tratamiento (Doxiciclina más Dipropionato de Imidocarb) cubre un campo de acción más amplio sobre otros antígenos transmitidos por garrapatas.

6.2. Recomendaciones

Combinar ambos medicamentos genera una mayor certeza de que se eliminó totalmente la *Rickettsia* del cuerpo de los pacientes y otras posibles infecciones hemoparasitarias asociadas.

Diagnosticar la enfermedad mediante métodos moleculares tiene que ser siempre el análisis que se debería seguir, pero debido a que usualmente no todos los propietarios cuentan con los recursos económicos necesarios para realizar estos análisis, se aconseja utilizar métodos serológicos (kit de ELISA) que actualmente ayudan mucho con el diagnóstico de estas enfermedades hemoparasitarias.

Un punto muy importante es el uso de medicamentos para controlar al vector transmisor de esta *Rickettsia*, ya sea mediante el uso de isoxazolinas o de fenilpirazoles o mejor aún una combinación de ambos productos y su aplicación estricta a los tiempos estipulados de acuerdo a lo establecido por los fabricantes.



REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>

Balassiano, I. T., Bastos, M. D. C. D. F., Madureira, D. J., Da Silva, I. G., De Freitas-Almeida, Â. C., & De Oliveira, S. S. (2007). The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7), 861–866. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000121>

BioNote. (2016). *Antigen Rapid CaniV-4*. 16.

Cabrera, C., Gomez, R., & Zuñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos , antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Redalyc*, 38(2), 149–158.

Carrion, F. (2016). Cambios hematológicos en caninos positivos a *Ehrlichia canis* tratados con dipropionato de imidocarb. *Universidad Nacional Hermilio Valdizán*. <http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/UNHEVAL/4761>

Chandrashekar, R., Mainville, C. A., Beall, M. J., Connor, T. O., Eberts, M. D., Alleman, A. R., Gaunt, S. D., & Breitschwerdt, E. B. (2010). ELISA for the detection of antibodies against antigen in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 71(12), 1443–1450.

Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors*, 1(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>

Dawson, J. E., Stallknecht, D. E., Howerth, E. W., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W. R., Lockhart, J. M., Nettles, V. F., Olson, J. G., & Childs, J. E. (1994). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical*



Microbiology, 32(11), 2725–2728. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994>

Fourie, J. J., Horak, I., Crafford, D., Erasmus, H. L., & Botha, O. J. (2015). The efficacy of a generic doxycycline tablet in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 86(1), 1–10. <https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1193>

Freire, D. A. C., Oliveira, I. V. P. M., Ferreira, H. I. P., Andrade, V. C. P., Silva, C. R. F., Kurissio, J. K., Ullmann, L. S., Malossi, C. D., Joaquim, S. F., Araújo Júnior, J. P., Langoni, H., Calabuig, C., Megid, J., & Antunes, J. M. A. P. (2017). Abortion and fetal death in bitches due anemia caused by vector-borne diseases. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(5), 1326–1330. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9439>

Garcia, D., Martins, K., Gomes, D., & Cortezi, A. M. (2018). *Discente do curso de Medicina Veterinária UNILAGO Erliquiose e anaplasrose são doenças infecciosas causadas pelas bactérias Ehrlichia canis e Anaplasma platys , respectivamente . Essas bactérias são parasitas obrigatórias das células laboratoriais . O tra.*

Goulart, R., Júnior, D. P., Almeida, R. D., Almeida, F. De, Regia, V., & Sousa, F. (2018). Erliquiose monocítica canina : Relato de Caso. *Pubvet*, 12(4), 1–3.

Gutiérrez, C. N., Martínez, M., Sánchez, E., De Vera, M., Rojas, M., Ruiz, J., & Triana-Alonso, F. J. (2008). Cultivation and molecular identification of Ehrlichia canis and Ehrlichia chaffeensis from a naturally co-infected dog in Venezuela. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(3), 258–265. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00046.x>

Gutierrez, C., Perez, L., & Agrela, I. (2016). Ehrlichiosis canina. *Saber*, 28(4), 641–665.

Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., & Shaw, S. (2004). Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental Ehrlichia canis infection. *Antimicrobial*



Agents and Chemotherapy, 48(11), 4488–4490.
<https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4488-4490.2004>

Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., & Bark, H. (1998). Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 2140–2142.
<https://jcm.asm.org/content/36/7/2140>

Jara, M. (2007). TETRACICLINAS: UN MODELO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 22(1–2), 49–55.
<https://doi.org/10.5354/0719-5273.2010.915>

Jimenez, L., Cala, F., & Beatriz, L. (2017). La Ehrlichiosis canina : Ehrlichia canis (caso clínico). *REDVET*, 18(8).

Jongejan, F., Crafford, D., Erasmus, H., Fourie, J. J., & Schunack, B. (2016). Comparative efficacy of oral administrated afoxolaner (NexGard™) and fluralaner (Bravecto™) with topically applied permethrin/imidacloprid (Advantix®) against transmission of Ehrlichia canis by infected Rhipicephalus sanguineus ticks to dogs. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1636-9>

Kledmanee, K., Suwanpakdee, S., Krajangwong, S., Chatsiriwech, J., Suksai, P., Suwannachat, P., Sariya, L., Buddhirongawatr, R., Charoonrut, P., & Chaichoun, K. (2009). Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of ehrlichia cans, babesia spp and hepatozoon canis in canine blood. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(1), 35–39.

Kondethimmanahalli, C., & Ganta, R. (2018). Impact of Three Different Mutations in Ehrlichia chaffeensis in Altering the Global Gene Expression Patterns. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24471-3>

López, C. (2018). “CARACTERIZACIÓN DE LOS DAÑOS MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS DE ÓRGANOS PARENQUIMATOSOS OBTENIDOS DE PERROS INFECTADOS POR Ehrlichia canis: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA CUALITATIVA.” *Tesis de Pregrado*.



<http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/94394>

Marcondes, M. (2016). Detection of Ehrlichia canis, Babesia vogeli and Toxoplasma gondii and DNA in the brain of dogs naturally infected with Leishmania infantum. *Journal of Parasitology*.

McClure, J., Crothers, M., Schaefer, J., Stanley, P., Needham, G., Ewing, S., & Stich, R. (2010). Efficacy of a Doxycycline Treatment Regimen Initiated during Three Different Phases of Experimental Ehrlichiosis □. *Antimicrobial*, 54(12), 5012–5020. <https://doi.org/10.1128/AAC.01622-09>

Movilla, R., García, C., Siebert, S., & Roura, X. (2016). Countrywide serological evaluation of canine prevalence for Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi (sensu lato), Dirofilaria immitis and Ehrlichia canis in Mexico. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1686-z>

Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Billinis, C., Leontides, L. S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., & Fytianou, A. (2003). Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): A comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 91(2–3), 197–204. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00298-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00298-5)

Mylonakis, M., Harrus, S., & Breitschwerdt, E. B. (2019). An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *Veterinary Journal*, 246, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.015>

Nelson, R., & Couto, G. (2010). *Medicina Interna de Pequeños Animales* (Cuarta). Elsevier Ltd.

Nitture, B., Kasaraliker, V. R., Halmandge, S. C., Ravindra, B. G., Kulkarni, S., & Patil, N. A. (2020). Clinico, Haemato-Biochemical Changes and Therapeutic Management of Anaplasmosis. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(3), 1440–1449. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.903.168>

Olowe, O., Idris, O., & Taiwo, S. (2013). Prevalence of TET genes mediating



tetracycline resistance in *Escherichia coli* clinical isolates in Osun State, Nigeria. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(2), 135–140. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.2.7>

Pantaleón, K. A. A., Alarcón, M. E. Z., & Castro, D. L. P. (2017). Efectividad del dipropionato de imidocarb frente a la doxiciclina en el tratamiento de *Babesia* SPP. en perros. *Reciamuc*, 1(4), 57–68. <https://doi.org/10.26820/reciamuc/1.4.2017.57-68>

Peña, I., Vidal, F., del Toro, A., & Hernandez, A. (2018). Uso de la oxitetraciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis canina : estudio retrospectivo de 15 casos en Camagüey , Cuba. *Scielo*, 29(2), 699–705. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14493>

QIAGEN. (2012). *Manual del Kit QIAamp(R) DSP DNA Blood Mini Versión 2*. 1–38. www.qiagen.com.

Ramakant, Kumar, R., Verma, H., & Diwakar, R. (2020). Canine ehrlichiosis : A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(January), 1849–1852.

Rodriguez, C. a, Hernandez, A., Beristain, D. M., & Martin, U. (2008). *Causa De Muerte En Perros Positivos a*. 28(1), 68. <http://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v28n1/11307064v28n1p68.pdf>

Romero, D. (2014). *Parámetros ecocardiográficos en modo b/m, electrocardiográficos, presión arterial, saturación de oxígeno, valores hematológicos evaluados en 2 pisos altitudinales en perros sanos*. 131. <http://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1143/1/125.pdf>

Rotondano, T. E. de F., Almeida, H. K. A., Krawczak, F. da S., Santana, V. L., Vidal, I. F., Labruna, M. B., de Azevedo, S. S., de Almeida, A. M. P., & de Melo, M. A. (2015). Pesquisa de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães de uma região semiárida do Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 24(1), 52–58. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015011>

Sainz, A. (1996). *Aspectos clinicos y epizootiologicos de la ehrlichiosis canina*.



Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. 978-84-8466-467-3, 85-86.

Sainz, A., Tesouro, M. A., Amusategui, I., Rodríguez, F., Mazzucchelli, F., & Rodríguez, M. (2000). Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 14(2), 134-139. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02226.x>

Saito, T. B., Thirumalapura, N. R., Shelite, T. R., Rockx-Brouwer, D., Popov, V. L., & Walker, D. H. (2015). An animal model of a newly emerging human ehrlichiosis. *Journal of Infectious Diseases*, 211(3), 452-461. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu372>

Sato, M., Veir, J. K., Shropshire, S. B., & Lappin, M. R. (2020). Ehrlichia canis in dogs experimentally infected, treated, and then immune suppressed during the acute or subclinical phases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(3), 1214-1221. <https://doi.org/10.1111/jvim.15750>

Sousa, M., Higa, A., Gerardi, D., Tinucci-Costa, M., & Machado, R. (2021). Tratamento da Erliquiose Canina de Ocorrência Natural com Doxiciclina, Precedida ou não pelo Dipropionato de Imidocarb. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951-952., 2013-2015.

Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). Farmacologia Veterinaria. In *La Semana médica* (Vol. 111, Issue Suppl 5).

Valero, J. A. (2016). *Evaluación de la calidad de prescripción de antibióticos en animales de compañía de cuatro clínicas de la ciudad de Bogotá*. 89. <http://bdigital.unal.edu.co/51961/1/julieandreavaleroalan.2016.pdf>

Vargas, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>



Zetina, M., Gallegos, J., & Rosado, K. (2019). Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Revista Chilena de Infectología*, 36(5), 650–655. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000500650>



ANEXOS

Anexo 1: Operacionalización de las variables

| Variables | Tipo de Variable | Dimensiones | Definición | Indicadores | Unidad de medida | Prueba |
|--------------------------------------------------------------|------------------|-------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|--------------|
| Presencia o ausencia de <i>Ehrlichia canis</i> (diagnóstico) | Cualitativa | Presencia | Bacteria manifestada en Ehrlichiosis monocítica canina | Presencia de la rickettsia <i>Ehrlichia canis</i> | Presencia o ausencia | Chi-cuadrado |
| | | Ausencia | | | | |
| Presencia o ausencia de <i>Ehrlichia canis</i> | Cualitativa | 30 días | Presencia | Presencia de la rickettsia <i>Ehrlichia canis</i> | Presencia o ausencia | Chi-cuadrado |
| | | | Ausencia | | | |
| | | 45 días | Presencia | | | |
| | | | Ausencia | | | |
| | | 60 días | Presencia | | | |
| | | | Ausencia | | | |



Anexo 2: Formato de Hoja Clínica



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Agropecuarias
MAESTRÍA DE MEDICINA CANINA Y FELINA

Tema de trabajo de titulación

Autor: _____

fecha: _____

Historia clínica

| Datos del propietario | | Datos del paciente | |
|-----------------------|--|--------------------|--------------|
| Nombres: | | Nombre: | Procedencia: |
| Ciudad: | | Especie: | Raza: |
| Dirección: | | Edad: | Sexo: |
| Teléfonos: | | Tamaño: | Color: |
| Nº de mascotas: | | Habitación: | Peso: |

Anamnésticos

| | | |
|---------|------------------------|-----------------------|
| Hembras | Ultimo celo: | |
| | Fecha y tipo de parto: | Nº Crías: M () H () |

Enfermedades anteriores: _____

Tratamientos anteriores: _____

Alimentación:

Conducta: Tranquilo () Nervioso () Agresivo () Decaído ()

Motivo de consulta

Examen clínico

| | | | | |
|-------|---------------|--------|--------|-----------------------|
| F.C | Temperatura: | TLLC: | Color | Conjuntiva/Oral/Genit |
| F. R: | Linfonódulos: | Pulso: | Mucosa | al: |

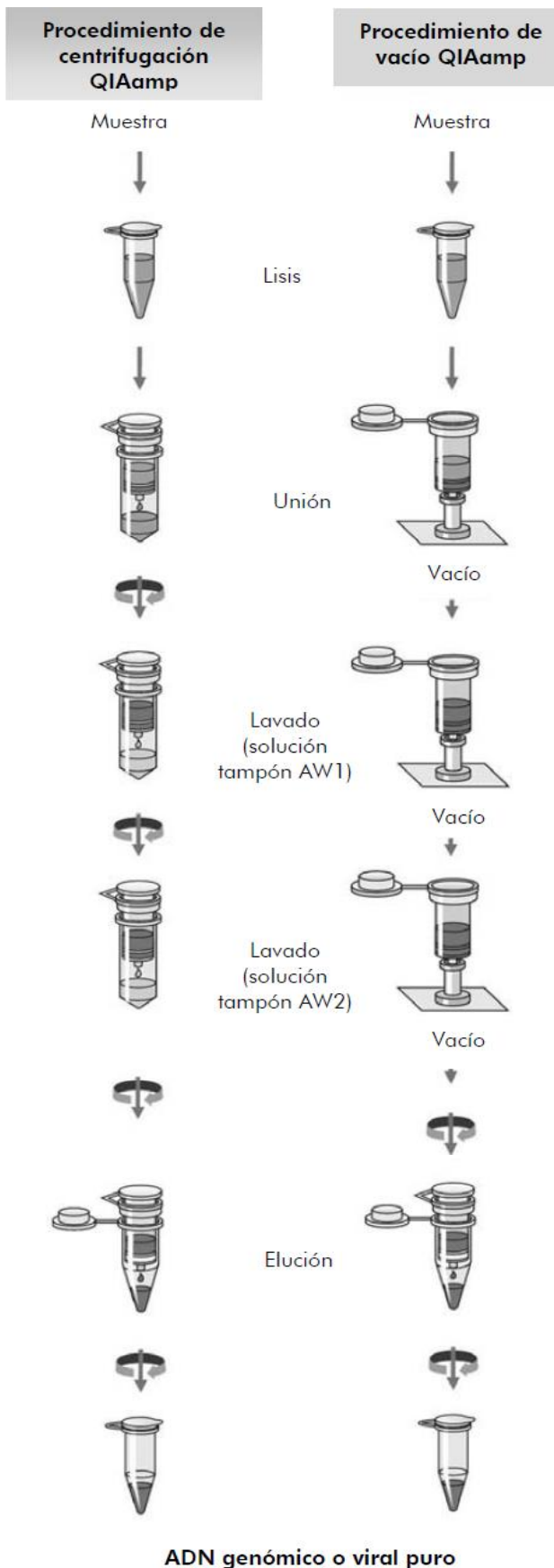
Lista de problemas

Exámenes complementarios

| | | | |
|------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| Cuadro Hemático <input type="checkbox"/> | Química <input type="checkbox"/> | Urológico: <input type="checkbox"/> | RX: <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Sanguín <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Ecografía: <input type="checkbox"/> | Urianalisis <input type="checkbox"/> | Gases sanguíneos <input type="checkbox"/> | EEG: <input type="checkbox"/> |
| Antibiograma: <input type="checkbox"/> | Citología <input type="checkbox"/> | Cultivos: <input type="checkbox"/> | ECG: <input type="checkbox"/> |
| Bromatología: <input type="checkbox"/> | Otros: <input type="checkbox"/> | | |



Añexo 3. Procedimiento de kit QIAamp.



Añada a un tubo de lisis (LT) 20 µl de QP, 200 µl de muestra y 200 µl de AL.

Agite con la agitadora vorticial 15 segundos.

Incube 10 minutos (± 1 minuto) a 56°C (± 1°C).

Añada 200 µl de etanol.

Agite con la agitadora vorticial 15 segundos.

Transfiera el lisado a la columna de centrifugación QIAamp Mini.

Procedimiento de centrifugación: centrifugue 1 minuto a 6.000 x g.

Procedimiento de vacío: aplique vacío.

Procedimiento de centrifugación: ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado nuevo, añada 500 µl de AW1 y centrifugue 1 minuto a 6.000 x g.

Procedimiento de vacío: añada 750 µl de AW1 y aplique vacío.

Procedimiento de centrifugación: ponga la columna de centrifugación

QIAamp Mini en un nuevo tubo de lavado, añada 500 µl de AW2 y

centrifugue 1 minuto a la máxima velocidad

(aproximadamente 20.000 x g o 14.000 rpm).

Procedimiento de vacío: añada 750 µl de AW2 y aplique vacío.

Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado.

Centrifugue 3 minutos a la máxima velocidad

(aproximadamente 20.000 x g o 14.000 rpm).

Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de

elución.

Añada 50–200 µl de AE e incube durante 1 minuto.

Centrifugue 1 minuto a 6.000 x g



Anexo 4. Resultados del análisis de las muestras de todo el estudio Tabla de resultados.

| N | Paciente | Tratamiento | | inicial | | 30 días | | 45 días | | 60 días | |
|----|-----------|-------------|------------------------|---------|---|---------|---|---------|---|---------|---|
| | | Doxiciclina | Doxiciclina+ Imidocarb | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 1 | JACHI | | | | | | | | | | |
| 2 | MILU | | | | | | | | | | |
| 3 | PINTO | | | | | | | | | | |
| 4 | HASKY | | | | | | | | | | |
| 5 | NIÑO | | | | | | | | | | |
| 6 | ROCKY | | | | | | | | | | |
| 7 | VALENTINO | | | | | | | | | | |
| 8 | PELUSA | | | | | | | | | | |
| 9 | BLACKY | | | | | | | | | | |
| 10 | NEGRA | | | | | | | | | | |
| 11 | CARAMELO | | | | | | | | | | |
| 12 | SASHA | | | | | | | | | | |
| 13 | TOBY | | | | | | | | | | |
| 14 | SASHA | | | | | | | | | | |
| 15 | BOMBOM | | | | | | | | | | |
| 16 | REX | | | | | | | | | | |
| 17 | CHINITA | | | | | | | | | | |
| 18 | LUCAS | | | | | | | | | | |
| 19 | JACK | | | | | | | | | | |
| 20 | TEO | | | | | | | | | | |
| 21 | TITA | | | | | | | | | | |
| 22 | KIARA | | | | | | | | | | |
| 23 | COBY | | | | | | | | | | |
| 24 | BALTO | | | | | | | | | | |
| 25 | ZACK | | | | | | | | | | |
| 26 | OSO | | | | | | | | | | |
| 27 | RASMUS | | | | | | | | | | |
| 28 | MANCHITAS | | | | | | | | | | |
| 29 | FLACUS | | | | | | | | | | |
| 30 | RUFO | | | | | | | | | | |
| 31 | ABI | | | | | | | | | | |
| 32 | BRUCE | | | | | | | | | | |
| 33 | BLANQUITA | | | | | | | | | | |
| 34 | NENA | | | | | | | | | | |
| 35 | BETY | | | | | | | | | | |
| 36 | NOAH | | | | | | | | | | |
| 37 | LUCAS | | | | | | | | | | |
| 38 | MARLY | | | | | | | | | | |
| 39 | LUPITA | | | | | | | | | | |
| 40 | KARY | | | | | | | | | | |



Anexo 5. Comparativa de positivos y negativos a los 30 días entre cada tratamiento.

| | TRATAMIENTO | | Total |
|----------------|-------------|----------------------------|-------|
| | DOXICICLINA | DOXICICLINA + IMIDOCARB | |
| DIA30 POSITIVO | 1 | 0 | 1 |
| NEGATIVA | 19 | 20 | 39 |
| Total | 20 | 20 | 40 |

Anexo 6. Prueba de chi-cuadrado.

| | Valor | gl | Sig. asintótica (2 caras) | Significación exacta (2 caras) | Significación exacta (1 cara) |
|----------------------------------------|--------------------|----|------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,026 ^a | 1 | ,311 | | |
| Corrección de continuidad ^b | ,000 | 1 | 1,000 | | |
| Razón de verosimilitud | 1,412 | 1 | ,235 | | |
| Prueba exacta de Fisher | | | | 1,000 | ,500 |
| Asociación lineal por lineal | 1,000 | 1 | ,317 | | |
| N de casos válidos | 40 | | | | |

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,50.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2



Anexo 7: Registro fotográfico.



Imagen 1. Equipos utilizados para el trabajo de campo, en donde tenemos de izquierda a derecha: vortex, micropipetas y analizador de ácidos nucleicos



Imagen 2. Equipo para procesamiento de muestras (cabina de seguridad biológica y centrifuga).



Imagen 3. Grupo de muestras y rotulación.



Imagen 4. Procesamiento de muestras.