

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Detección de *Ehrlichia canis* mediante PCR en tiempo final en muestras de sangre canina sospechosas provenientes de la zona de Lima Norte”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Andrea Estefanía Vicente Villanueva

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA- PERÚ

2017

A Dios y a mis padres por abrir mi camino hacia esta hermosa carrera, a mi mamá Rosita por cuidarme, motivarme, impulsarme a crecer siempre y a confiar en mí, gracias por tanto amor y a mis hermanos por el apoyo y la fortaleza brindada.

Agradezco a Marcela Mora por el constante apoyo, por los conocimientos brindados y el empuje a continuar a pesar de las adversidades, al Laboratorio Vet Support por brindarme las muestras necesarias para el estudio y al Dr. Hung por brindarme los espacios del Laboratorio de Biología molecular para la realización de este estudio.

ABSTRACT

Ehrlichia canis is considered the most important causal agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). This disease, whose clinical signs are nonspecific, may be confused with other diseases in canines and due to the limitations of the diagnostic tests available in our country, there is a problem of diagnosis and thus could be providing inadequate treatments. The aim of the present study was to establish the frequency of detection of *E.canis* in samples of canine blood suspected of CME (anemia, leukopenia and thrombocytopenia) to the blood count and negative to the blood smear in the period August - October 2016, through the use of Polymerase chain reaction (PCR) as a precise and sensitive detection tool, unlike those currently used in the veterinary clinical area of the country. For this purpose, 30 samples of canine blood were taken, which were analyzed by PCR to detect *Ehrlichia spp.* and *Ehrlichia canis*. Of the samples evaluated, 43.3% (13/30) were positive to *Ehrlichia spp.*, and 36.67% (11/30) were positive to *E.canis*. *E.canis* positive PCR were detected only with blood count suggestive of the disease, with frequency of 36.67% of samples positive to *E.canis*. There are 6.63% negative samples to *E.canis* but were positive positive to *Ehrlichia spp.*, indicating that there is a possible infection of dogs with other species different from *E.canis* that are not being detected.

Key words: *Ehrlichia canis*, PCR, canine blood

RESUMEN

Ehrlichia canis es considerado el agente causal más importante de la Ehrlichiosis monocítica canina (EMC), esta enfermedad, cuyos signos clínicos son inespecíficos en los caninos, puede confundirse con diversas enfermedades y debido a las limitaciones de las pruebas diagnósticas disponibles en nuestro país, existe un problema diagnóstico y así podrían estar brindándose tratamientos inadecuados. El objetivo del presente estudio fue establecer la frecuencia de detección de *E. canis* en muestras de sangre canina sospechosas de EMC (anemia, leucopenia y trombocitopenia) al hemograma y negativas al frotis sanguíneo en el período Agosto – Octubre 2016, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una herramienta de detección precisa y sensible a diferencia de las utilizadas actualmente en el área clínico veterinario del país. Para este fin se tomaron 30 muestras de sangre canina, las cuales fueron analizadas por PCR para detectar *Ehrlichia spp.* y *Ehrlichia canis*. De las muestras evaluadas el 43,3% (13/30) fueron positivas a *Ehrlichia spp.*, y el 36.7 % (11/30) fueron positivas a *E. canis*. Se logró detectar muestras PCR positivas a *E. canis* sólo con hemograma sugerente de la enfermedad, encontrándose una frecuencia del 36.7% de muestras positivas a *E. canis*. Existe un 6.6 % de muestras negativas a *E. canis* pero que fueron positivas a *Ehrlichia spp.*, lo que indicaría que existe una posible infección de perros con otra especie distinta a *E. canis* que no está siendo detectada.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, PCR, sangre canina.

INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad de distribución mundial potencialmente fatal en caninos, teniendo como agente más importante a *Ehrlichia canis*, un microorganismo intracelular obligado del orden Rickettsiales, encontrado principalmente en sangre periférica, la cual infecta a los caninos, parasitando y replicándose por fisión binaria dentro de una vacuola citoplasmática en los monocitos circulantes y macrófagos en forma de mórulas (Mylonakis *et al.*, 2004).

Esta bacteria es transmitida por la picadura de la garrapata marrón *Rhipicephalus sanguineus* (Parnell N., 1993), aunque otras especies especies de garrapatas también están involucradas como vectores, por ejemplo, se ha reportado que experimentalmente puede ser transmitida por la garrapata *Dermacentor variabilis* (Johnson *et al.*, 1998).

La EMC es una enfermedad multisistémica y puede cursar de 3 fases en los caninos: aguda, subclínica y crónica. A medida que va avanzando, la médula ósea se ve afectada en todas sus líneas celulares, provocando en algunos casos aplasia medular, lo cual resultará en la presencia de un cuadro severo de pancitopenia, que suele con llevar a la muerte del paciente. (Bulla *et al.*, 2004). La evidencia actual indica que los animales que sufren EMC por lo general presentan en el hemograma: anemia trombocitopenia y leucopenia, lo que hace que este hallazgo sea sugerente para la enfermedad en caninos. (Hoyos *et al.*, 2007; Zegarra ,2015)

E. canis además de provocar la EMC en perros, tiene un rol zoonótico ya confirmado mediante diagnóstico molecular en el país vecino Venezuela (Vinasco *et al.*, 2007). Así mismo, un último estudio en Lima - Perú encontró, que el 14,3% de propietarios de caninos domésticos con antecedentes de Ehrlichiosis fueron seropositivos a *Ehrlichia canis*. (Barrios *et al.*, 2013).

Frecuentemente, las pruebas de diagnóstico más usadas para detectar la enfermedad en nuestro medio son hemogramas, pruebas serológicas y frotis directo, sin embargo la observación de la bacteria en frotices sanguíneos, es considerada la correcta prueba de oro en Ehrlichiosis canina (Rotondano *et al.*, 2012), aunque es de baja sensibilidad debido a su bajo porcentaje de infección celular (menos del 1%) y solo se observa en la fase aguda de la enfermedad. Estas mórulas son poco probables de detectar en la fase crónica de la enfermedad en animales infectados (Waner T., et al., 2001). Por ello, el diagnóstico de la EMC es muy difícil, se necesitan pruebas altamente específicas y sensibles, como la PCR, la cual detectaría la enfermedad en cualquiera de sus 3 fases independientemente si el animal tenga signos clínicos o no, lo cual facilitaría a tener diagnósticos certeros, y tratamientos adecuados a tiempo para la enfermedad, antes que progrese a una fase crónica lo cual puede conllevar a la muerte del paciente canino. (Bulla *et al.*, 2004)

En el 2006 se realizó un estudio que detectó *E.canis*, utilizando la técnica de PCR, en 70% de los caninos estudiados (23/33) en Chosica (Aguirre, 2006) y en el 2007 por primera vez, un estudio documentó la infección de perros en Perú con *E.canis* usando métodos moleculares (Vinasco et al., 2007), después de ello no se han reportado estudios en el país utilizando PCR para detección de *E. canis*. Los altos costos del PCR hacen que esta prueba no sea utilizada en nuestro medio.

El objetivo del estudio fue estimar la frecuencia de *Ehrlichia canis* mediante la detección por PCR en muestras de sangre canina sospechosas de EMC al hemograma y sin presentación de mórulas, remitidas de diferentes clínicas veterinarias de la zona norte de Lima durante los meses de agosto-octubre 2016.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de estudio

Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

2. Tipo de estudio

Observacional descriptiva.

3. Recolección y selección de muestra

Las muestras utilizadas en el presente estudio, fueron recolectadas entre agosto y octubre 2016 de un Laboratorio de Diagnóstico Veterinario, ubicado en el distrito de Los Olivos, para posteriormente ser procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se recolectaron 30 muestras de sangre canina con hemograma compatible a EMC en las cuales no se observaron mórulas, pero que presentaron alteraciones compatibles de la enfermedad en el análisis hematológico: anemia (hematocrito menos del 36%), leucopenia (menos de 9000 leucocitos μl^{-1}) y trombocitopenia (menos de 200,000 plaquetas μl^{-1}).

4. Procesamiento de muestra y extracción de ADN

Las muestras de sangre se encontraban almacenadas en tubos con EDTA a 4°C por un periodo no mayor de 24 horas para su posterior uso en PCR. Para la extracción de ADN se utilizó 100 μl de

sangre entera contenida en los tubos de almacenamiento y fue realizada con el kit de extracción Blood DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y pureza de ADN se midió en un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific®, USA).

5. Elaboración de controles positivos y secuenciamiento

El producto de PCR fue purificado con el kit AxyPrep DNA gel extraction (AXYGEN Biosciences, USA) y secuenciado (Macrogen, Corea del Sur). La homología de las secuencias se verificó utilizando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando la herramienta de alineamiento BLASTn.

6. Valor diagnóstico del PCR: Sensibilidad, especificidad y límite de detección

Para hallar el valor diagnóstico de la prueba desarrollada, se seleccionaron 10 muestras positivas a Ehrlichia de pacientes enfermos y con presencia de mórula; y 10 muestras de pacientes sanos, sin hemograma compatible a EMC y ausencia de mórula en frotis sanguíneo, con el fin de asegurar que el PCR desarrollado no detecte falsos positivos y negativos.

Se compararon los resultados de PCR obtenidos con los resultados del gold estándar (frotis sanguíneo) mediante la herramienta estadística de la tabla de contingencia 2x2.

El límite de detección se calculó mediante curvas estándar de diluciones decimales seriadas 1:10 por triplicado y utilizando el ADN cuantificado.

7. Detección por PCR en tiempo final de muestras sospechosas

La amplificación mediante PCR se realizó siguiendo el método descrito por Murphy *et al.* (1998) con algunas modificaciones en el ciclaje para el protocolo de *Ehrlichia canis*.

La detección de *Ehrlichia spp.* se llevó a cabo con 5 ul de ADN en un volumen final de 50 ul, conteniendo 1X PCR buffer 10X (Thermo Fisher Scientific ®, USA), 0.2 mM dNTP, 2.5 mM Mg Cl², 1.25 U Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific ®, USA) y 1 pmol de cada primer ECC 5'-GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' y ECB 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' reportados por Dawson et al. (1996), correspondientes al gen 16S ARNr, se siguió un protocolo inicial de 3 minutos a 94°C, 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 65°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Para *E. canis*, se utilizó el mismo protocolo de master mix utilizado para *Ehrlichia sp.*, la única variante fueron los primers utilizados: ECAN 5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' reportado por Murphy et al. (1998) y Dawson et al. (1996) y HE3 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' reportado por Anderson et al.(1992), correspondientes al gen 16S ARNr., el ciclaje consistió en un primer ciclo de 3 minutos a 94°C, 37 ciclos de 92°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto y 30 segundos, seguido de una extensión final de 72°C por 5 minutos.

El producto fue identificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% y bromuro de etidio, considerando positivas las bandas con un tamaño de 500 y 398 bp para *Ehrlichia spp.* y *E. canis* respectivamente.

8. Consideraciones éticas

El estudio no realizó manejo, manipulación o extracción de material biológico de manera directa en los animales, las consideraciones éticas radicarón en el respeto entre los profesionales involucrados y la confidencialidad de los datos generados.

RESULTADOS

1. Recolección y selección de muestras

De las muestras sanguíneas seleccionadas, 13 eran de hembras y 17 de machos, con edades entre 4 meses a 12 años; de raza inespecífica (13.3 %), mestizos (20%), Cocker spaniel (16.7%), Bóxer (6.7 %), Shitzu (6.7 %), Bull terrier (3.3 %), Chihuahua (3.3 %), Schnauzer (3.3 %), Pitbull (3.3%), Pastor Alemán (3.3%) y Pastor ovejero (3.3%). Estas muestras cumplían los criterios de inclusión de presentar un hemograma sospechoso a EMC, por lo tanto la principal alteración hematológica fue la pancitopenia. La trombocitopenia severa estaba presente en 20 muestras sanguíneas (66.67%), de manera moderada en 6 (20%), y de manera leve solo en 4 de las muestras (13.3%) (Cuadro 1).

2. Procesamiento de muestra y extracción de ADN

El método utilizado fue adecuado, obteniéndose una recuperación promedio de dsADN de $63.22 \pm 71.83 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ con un promedio de grado de pureza A260/A280 de $1.61 \pm 0.20 \text{ nm}$ (Cuadro 2).

3. Elaboración de controles positivos y secuenciamiento

El secuenciamiento del producto de PCR demostró ser 100% homólogo con las secuencias de referencia en NCBI correspondiente para *Ehrlichia spp.* y *E. canis*.

4. Valor diagnóstico del PCR: Sensibilidad , especificidad y límite de detección práctico

El método estandarizado es 100% específico, preciso y sensible para la detección de *Ehrlichia spp.* y *E.canis* con un límite de detección práctico (LDP) de $4,19 \times 10^{-8} \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN de *Ehrlichia spp.* y $4,19 \times 10^{-1} \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN de *E.canis*.

5. Detección por PCR en tiempo final

De las 30 muestras de sangre con pancitopenia pero sin inclusiones citoplasmáticas que fueron analizadas mediante la técnica de PCR convencional, se detectó ADN de *Ehrlichia spp.* evidenciado por una banda de 500 bp en 13 muestras (43,3%) (Figura 1 y 2). De las 13 muestras positivas, solo en 11 se detectó *E. canis* (36.7 %) con un tamaño de banda de 398 bp. (Figura 3 y 4).

DISCUSIÓN

La prueba Gold estándar en el diagnóstico de EMC es la observación de mórulas de Ehrlichia en el frotis sanguíneo, sin embargo, en este estudio se logró detectar ADN de *Ehrlichia spp.* en 13 (43.3%) muestras y solo *E. canis* en 11 muestras (36.7%), logrando una frecuencia de detección de 36% de la bacteria en muestras de sangre con pancitopenia y sin presencia de mórulas o inclusiones citoplasmáticas, demostrando que el PCR utilizado en el presente estudio fue 36.7% más sensible que la prueba por frotis sanguíneo para la detección de *E. canis*. Este resultado coincide con el estudio en Costa Rica por Romero et al. (2013) en donde se encontró una frecuencia del 36% de pacientes positivos a *E. canis* mediante PCR desde muestras sanguíneas sin presencia de mórulas.

Este resultado es similar pero en menor frecuencia al reportado por Aguirre (2006) donde se encontró que el 70% (23/33) de los caninos estudiados fueron positivos a *E. canis*, y esto podría probablemente deberse al hecho que los caninos en mención provenían de la zona de Chosica, la cual es una zona más tropical durante el año y por consiguiente la presencia del vector es más frecuente que en la zona Lima norte, por tanto la cantidad de pacientes afectados por EMC es elevada, además de ello en tal estudio se seleccionaron a los pacientes no sólo por hemograma compatible, sino también por signos clínicos compatibles e incluso serología positiva a la enfermedad, lo cual aumentaba la probabilidad de encontrar pacientes positivos para EMC. Estos resultados también sugieren que no todos los hemogramas con sospecha a EMC son positivos a la enfermedad y por ello; se requieren mayores exámenes de diagnóstico, tanto clínicos como de laboratorio que confirmen la infección. Así mismo cabe indicar que existen otras patologías asociadas a la presentación de la pancitopenia, tales como quimioterapia asociada a la pancitopenia,

babesiosis (Akel & Mobarakai, 2017), infección por parvovirus, distemper, histiocitosis maligna, anemia aplásica idiopática, sepsis, síndrome mielodisplásico, enfermedad hematológica inmunomediada, leucemia linfoblástica, toxicidad por estrógenos y mieloma múltiple (Weiss & Evanson , 1999) y que deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial.

Por otro lado, en 2 muestras positivas por PCR a *Ehrlichia spp.* no se logró detectar la presencia de ADN de *E.canis* mediante PCR, lo que podría indicar la presencia de otras especies de *Ehrlichia*, tales como *Ehrlichia chaffensis*, esta última agente causal de la EMH (Ehrlichiosis monocítica humana) en los caninos, ya sea como reservorio o provocando la enfermedad en los caninos. Estudios en Venezuela han reportado la presencia de *E.canis* y *E.chaffensis* confirmado mediante PCR en sangre canina, incluso reportaron co-infecciones entre ambas (Gutierrez et al., 2008), sumado a esto en Lima ya se ha reportado una seroprevalencia de 20% en personal que realizaba actividades veterinarias, los cuales presentaron anticuerpos para *E. chaffensis* (Paulino, 2011), lo cual genera mayor preocupación sobre el rol del canino como reservorio de la bacteria.

Es necesario mencionar, que las muestras que resultaron negativas a *Ehrlichia spp.* y *E.canis* al PCR puedan ser falsos negativos, ya que si bien las muestras de sangre proveen buenos resultados y son fáciles de obtener (Santos *et al.*, 2013), la detección del agente en sangre puede ir disminuyendo según progrese la infección, localizándose en mayor cantidad en bazo y/o médula ósea (Baneth et al.,2009; Mylonakis et al., 2004 ; Siarkou *et al.*, 2007). Según Makino *et al.* (2016) la médula ósea es un buen lugar para el diagnóstico molecular de Ehrlichiosis canina, particularmente cuando hay sospecha de la infección y las muestras sanguíneas resultan negativas.

La trombocitopenia ha sido considerada el hallazgo hematológico más común y consistente en perros afectados con EMC (Silva *et al.*, 2012) , pero en el presente estudio se observó que de las 30

muestras con cuadros de trombocitopenia, 19 (63.3%) resultaron negativas a *E. canis*, esto coincide con un estudio, donde no todos los pacientes trombocitopénicos fueron positivos a EMC, sugiriendo que no es la única causa de trombocitopenia en perros, pudiendo ser trombocitopenias inmunomediadas, procesos neoplásicos, enfermedades inflamatorias, vasculitis, entre otras enfermedades (Milanjeet *et al.*,2014).

En el presente estudio se logró confirmar por PCR una frecuencia del 36.7 % de *E. canis* en muestras sanguíneas sospechosas a EMC al hemograma pero sin presencia de mórulas. Este estudio brinda información que permite confirmar que la bacteria se encuentra presente de manera activa en nuestro medio, además de demostrar que el análisis del hemograma tiene limitaciones para el diagnóstico de la enfermedad y que se lleva un mal diagnóstico de los pacientes de falsos negativos mediante la observación de mórulas en el frotis sanguíneo y esto de cierta forma conlleva a la cronicidad de la EMC, una difícil recuperación y en el peor de los casos la muerte de los pacientes.

CONCLUSIONES

- El PCR desarrollado en este estudio demostró ser 100% específico y 36.7 % más sensible que la observación de mórulas en la extensión sanguínea para la detección de *Ehrlichia canis*.
- La observación directa de la mórula en frotis sanguíneo como análisis para el diagnóstico de EMC tiene alto porcentaje de falsos negativos (43.3%).
- La detección de Ehrlichia mediante PCR evidencia la presencia de *E. canis* en elevada frecuencia en caninos y de otras especies de Ehrlichia posiblemente presentes, las cuáles no están siendo consideradas, por lo que se sugieren mayores estudios que incluyan la detección de esas especies debido a su importancia como agentes considerados potencialmente zoonóticos.

Cuadro 1: Hemograma básico de muestras sanguíneas de caninos (Agosto- octubre 2016). Resultados de PCR para *Ehrlichia spp.* y *Ehrlichia canis*

N° de muestra	Paciente	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Eritrocitos (µl)	Leucocitos (µl)	Plaquetas (µl)	<i>Ehrlichia spp.</i>	<i>E. canis</i>
1	Rocky	34.2	12,0	5,740,00	700	54,600	-	-
2	Tofi	35.7	10,7	5,400,00	7,27	<15,000	-	-
3	Pelusa	32.2	9,5	4,300,00	4,08	<15,000	+	+
4	Petty	30.8	10,0	5,220,00	6,59	<15,000	+	+
5	Oso 1	32.9	9,4	5,030,00	7,71	<15,000	-	-
6	Arco	8	2,1	1,100,00	0,54	<15,000	+	+
7	Estrella	31.9	8,6	4,700,00	3,41	<15,000	+	+
8	Duqueza	22.4	6,8	2,910,00	6,05	63,000	-	-
9	Orestes	35.4	10,6	5,200,00	7,06	40,200	-	-
10	Bella	35.2	11,2	4,610,00	8,71	184,600	+	+
11	Malui	31.2	10,2	4,190,00	7,27	<15,000	-	-
12	Machin	15.1	5,1	2,350,00	6,66	<25,000	+	+
13	Marly	35.8	13,2	5,980,00	6,64	<15,000	+	-
14	Pelusa	18.1	5,9	3,090,00	7,69	108,600	-	-
15	Nacho	30.2	9,6	4,200,00	8,54	<25,000	-	-
16	Chico	31.9	10,6	5,400,00	7,46	136,100	+	+
17	Peque	33.8	11,2	4,800,00	4,41	<25,000	+	+
18	Ody	9.4	2,8	1,120,00	0,94	<15,000	-	-
19	Oso2	32.6	10,7	5,820,00	7,52	144,300	+	-
20	Meñique	32.5	9,2	5,030,00	1,24	<15,000	+	+
21	Dolly	25.5	7,2	3,480,00	5,25	<15,000	-	-
22	Mily	22.7	7,2	3,260,00	0,59	<15,000	-	-
23	Oso 3	9	2,6	1,150,00	4,99	<15,000	+	+
24	Pequeña	35	15,6	6,870,00	4,65	88,400	-	-
25	Winner	25.3	8,5	4,520,00	6,99	37,900	-	-
26	Shona	11.4	3,9	2,350,00	0,43	<15,000	-	-
27	Lassy	6.7	1,8	0,840,00	1,39	<15,000	-	-
28	Jean	35.4	1,4	6,210,00	3,49	<25,000	-	-
29	Taysson	25.4	8,3	3,860,00	5,04	48,600	-	-
30	Bethoven	24.2	7,4	3,790,00	8,29	<25,000	+	+

Cuadro 2. Concentración y pureza de ADN extraído de las muestras sanguíneas de pacientes caninos sospechosos a Ehrlichiosis monocítica canina.

N°	Fecha	Muestra	Conc.	Unit.	Factor	A 260/ A 280
1	19/01/2017	ROCKY	22,3	ng/μl	50.0	1.58
2	19/01/2017	TOFI	51,9	ng/μl	50.0	1.65
3	19/01/2017	PELUSA	17,4	ng/μl	50.0	1.33
4	19/01/2017	PETTY	10,8	ng/μl	50.0	1.41
5	19/01/2017	OSO 1	12,4	ng/μl	50.0	1.63
6	19/01/2017	ARCO	18,7	ng/μl	50.0	1.62
7	19/01/2017	ESTRELLA	21,4	ng/μl	50.0	1.43
8	19/01/2017	DUQUEZA	19,8	ng/μl	50.0	1.76
9	19/01/2017	ORESTES	17,8	ng/μl	50.0	1.23
10	19/01/2017	BELLA	34,3	ng/μl	50.0	1.74
11	19/01/2017	MALUI	92,8	ng/μl	50.0	1.78
12	19/01/2017	MACHIN	75,6	ng/μl	50.0	1.66
13	19/01/2017	MARLY	11,8	ng/μl	50.0	1.66
14	19/01/2017	PELUSA	139,3	ng/μl	50.0	1.83
15	19/01/2017	NACHO	105,5	ng/μl	50.0	1.75
16	19/01/2017	CHICO	35,9	ng/μl	50.0	1.64
17	19/01/2017	PEQUE	164,9	ng/μl	50.0	1.83
18	19/01/2017	ODY	46,3	ng/μl	50.0	1.54
19	19/01/2017	OSO2	324,4	ng/μl	50.0	1.89
20	19/01/2017	MEÑIQUE	36,7	ng/μl	50.0	1.45
21	19/01/2017	DOLLY	181,8	ng/μl	50.0	1.85
22	19/01/2017	MILY	22,4	ng/μl	50.0	1.59
23	19/01/2017	OSO 3	72,1	ng/μl	50.0	1.75
24	19/01/2017	PEQUEÑA	45,5	ng/μl	50.0	1.67
25	19/01/2017	WINNER	72,5	ng/μl	50.0	1.77
26	19/01/2017	SHONA	19,3	ng/μl	50.0	1.16
27	19/01/2017	LASSY	20,4	ng/μl	50.0	1.24
28	19/01/2017	JEAN	66,8	ng/μl	50.0	1.29
29	19/01/2017	TAYSSON	70,0	ng/μl	50.0	1.41
30	19/01/2017	BETHOVEN	25,6	ng/μl	50.0	1.65

Cuadro 3. Resultados de PCR de las muestras sanguíneas sospechosas para *Ehrlichia spp.* y *E.canis* (Agosto – Octubre 2016)

	<i>Ehrlichia spp</i>	<i>E. canis</i>
Detectadas	13 (43.3%)	11 (36.7%)
No detectadas	17 (56.7 %)	19 (63.3%)
Total	30	

Figura 1. PCR de *Ehrlichia spp.* en muestras de sangre de caninos sospechosos al hemograma. (1) Marcador de tamaño molecular, (2) control positivo 500 bp,(3-14) muestras sanguíneas sospechosas, (15) control negativo.

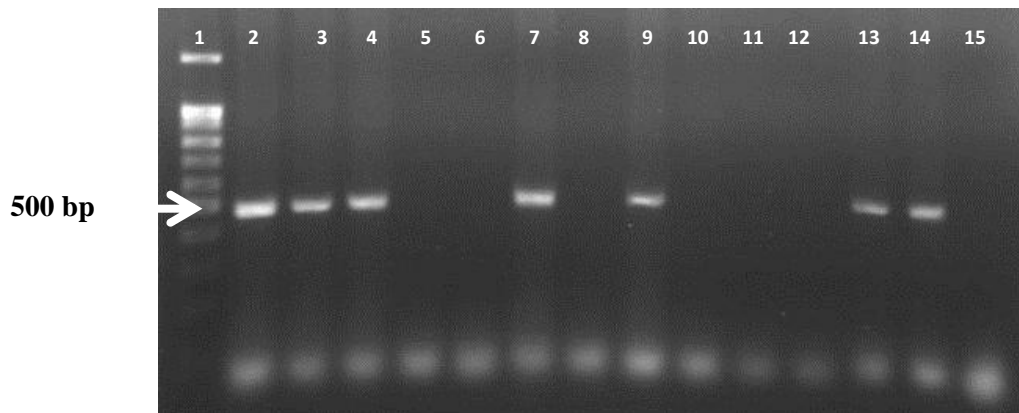


Figura 2. PCR de *Ehrlichia spp.* en muestras de sangre de caninos sospechosos al hemograma. (M) marcador de tamaño molecular, (2) control positivo 500 bp, (3-7) muestra sanguíneas sospechosas a *E. canis*, (8) control negativo.

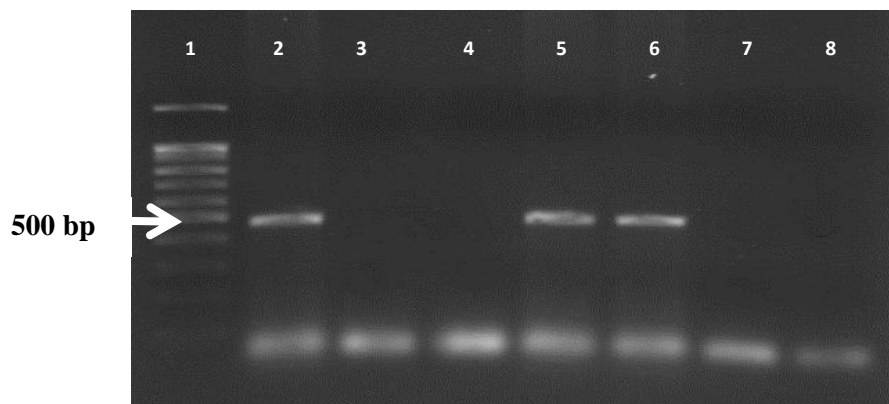


Figura 3. PCR de *Ehrlichia canis* en muestras de sangre de caninos sospechosos al hemograma. (1) Marcador de tamaño molecular, (2) control positivo 398 bp, (3-13) muestras sanguíneas sospechosas, (14) control negativo.

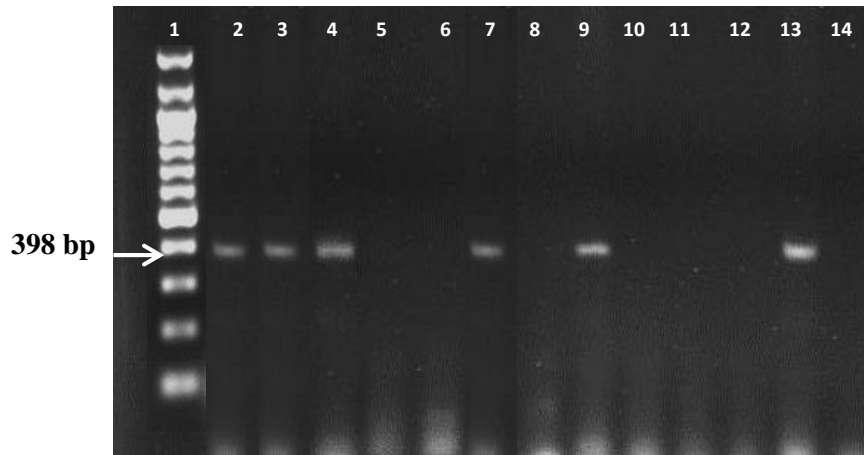
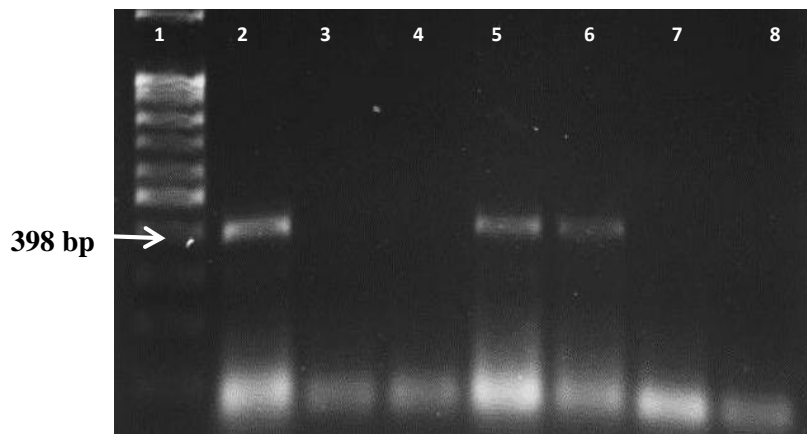


Figura 4. PCR de *Ehrlichia canis* en muestras de sangre de caninos sospechosos al hemograma. (M) marcador de tamaño molecular, (2) control positivo 398 bp, (3-7) muestra sanguíneas sospechosas a *E. canis*, (8) control negativo.



BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, R. (2006). Frecuencia de *Ehrlichia canis* en caninos con cuadros de pancitopenia provenientes del distrito de Chosica. Tesis de pregrado. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
2. Akel, T., & Mobarakai, N. (2017). Hematologic manifestations of babesiosis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 6.
3. Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S., & Schlesinger, Y. (2009). Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary microbiology*, 136(3), 321-325.
4. Barrios, L., Lí, O., Suárez, F., Manchego, A., & Hoyos, L. (2013). Evidencia hematológica y serológica de *Ehrlichia SPP* en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis en Lima metropolitana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(1), 64-71.
5. Bulla C, Takahira RK, Araújo JP, Trinca LA, Lopes RS, Wiedmeyer CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic área. *Vet Res*, 2004; 35: 141- 146
6. Gutierrez, C. N., Martinez, M., Sanchez, 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.
7. Hoyos, S., Li, E., Alvarado, S., Suárez, A., & Díaz, C. (2007). Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(2), 129-135.

8. Johnson, E. M., Ewing, S. A., Barker, R. W., Fox, J. C., Crow, D. W., & Kocan, K. M. (1998). Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: *Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (Acari: *Ixodidae*). *Veterinary parasitology*, 74(2), 277-288.
9. Makino, H., Sousa, V. R. F., Fujimori, M., Rodrigues, J. Y., Dias, A. F. L. R., Dutra, V.,... & Almeida, A. D. B. P. F. (2016). *Ehrlichia canis* detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. *Ciência Rural*, 46(2), 310-314.
10. Milanjeet, S. H., Singh, N. K., Singh, N. D., Singh, C., & Rath, S. S. (2014). Molecular prevalence and risk factors for the occurrence of canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Medicine*, 59(3), 129-136.
11. Murphy, G. L., Ewing, S. A., Whitworth, L. C., Fox, J. C., & Kocan, A. A. (1998). A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary parasitology*, 79(4), 325-339.
12. Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2004;40: 174 – 184.
13. Paulino Ruiz, A. (2011). Detección serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia Chaffeensis* en humanos que realizan actividades veterinarias en Lima Metropolitana.
14. Pérez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*- like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2133-9.
15. Romero-Pérez, L. E., Dolz-Wiedner, G., Romero-Zúñiga, J. J., Meneses-Guevara, A. I., Jiménez-Soto, M., & Salazar-Sánchez, L. (2010). Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. Evaluation of the diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs from Costa Rica, using blood smears and molecular technique. *Revista de Ciencias Veterinarias (Heredia)*., 28(1), 23-36.

16. Santos, L. G. F. D., Melo, A. L. T., Moraes-Filho, J., Witter, R., Labruna, M. B., & Aguiar, D. M. D. (2013). Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 114-118.
17. Siarkou, V. I., Mylonakis, M. E., Bourtzi-Hatzopoulou, E., & Koutinas, A. F. (2007). Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary microbiology*, 125(3), 304-312.
18. Silva, G. C. F. D., Benitez, A. D. N., Giroto, A., Taroda, A., Vidotto, M. C., Garcia, J. L.,... & Vidotto, O. (2012). Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 379-385.
19. Vinasco, J., Li, O., Alvarado, A., Diaz, D., Hoyos, L., Tabachi, L. & Moro, M. H. (2007). Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. *Journal of clinical microbiology*, 45(8), 2716-2719.
20. Weiss, D. J., & Evanson, O. A. (1999). A retrospective study of canine pancytopenia. *Veterinary clinical pathology*, 28(3), 83-88.
21. Zegarra, J. (2015). Caracterización de las alteraciones hematológicas cuantitativas y cualitativas de pacientes caninos con evidencia de *Ehrlichia spp.* al frotis sanguíneo remitidos a un laboratorio de Lima Norte entre febrero del 2013 y 2014.