



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO**

**TRABAJO FINAL**

**TITULO:** “Diagnóstico hematológico y caracterización de patógenos transmitidos por vectores en caninos de la ciudad de Guayaquil, Ecuador”

**ALUMNO:** Ernesto Olaya Martínez

**DIRECTOR:** Gastón Moré

**CODIRECTOR:** Diego Fernando Eiras

**FECHA:** 17 de junio de 2015

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos son causadas por distintos patógenos (bacterias, protozoarios y helmintos), cuya transmisión es dependiente de la bionomía y distribución de ciertos vectores competentes (garrapatas, moscas, flebótomos, mosquitos, etc.). El presente trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia de patógenos transmitidos por vectores en 500 muestras de sangre canina de la ciudad de Guayaquil (Ecuador), mediante técnicas hematológicas y posterior confirmación con técnicas moleculares (PCR, PCR-RFLP y secuenciación). Además, se describieron las principales alteraciones hematológicas cuantitativas y cualitativas observadas en los animales infectados. Se detectó una tasa de infección para los distintos patógenos transmitidos por vectores del 8%, siendo: piroplasmas intraeritrocitarios 5%; mórulas intraleucocitarias 2,2% y microfilarias circulantes 0,8%. No se registraron coinfecciones en la observación microscópica. El tratamiento con enzimas de restricción del producto de amplificación por PCR de todas las muestras con piroplasmas al microscopio, evidenció un patrón de corte característico para la especie *Babesia vogeli*. Las secuencias obtenidas de los productos de amplificación por PCR específicas de los 3 grupos de patógenos se compararon con las secuencias reportadas en el Genbank. Se obtuvo 100% de identidad con *Babesia vogeli* en las muestras con piroplasmas intraeritrocitarios y 99-100% de identidad con *Ehrlichia canis* en las que presentaron mórulas intraleucocitarias. En los casos con microfilarias se obtuvo 99-100% de identidad con *Dirofilaria immitis* en 3 muestras y 100% de identidad con *Dipetalonema (Acanthocheilonema) reconditum* en una muestra. Las principales alteraciones hematológicas detectadas fueron: anemia, trombocitopenia, presencia de monocitos activados, policromacia y macroplaquetas. El presente estudio constituye la primer descripción molecular de *E. canis*, *B. vogeli*, *D. immitis* y *A. reconditum* en perros de la ciudad de Guayaquil, Ecuador.

## PALABRAS CLAVE

Piroplasmosis; ehrlichiosis; filariosis; perros; Ecuador

## Índice de contenido

INTRODUCCIÓN.....	5
Ehrlichiosis Monocítica Canina.....	5
Piroplasmosis.....	7
Filariosis.....	11
OBJETIVOS .....	15
Objetivo general .....	15
Objetivos específicos .....	15
HIPÓTESIS .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Estudios hematológicos .....	16
Estudios moleculares .....	17
RESULTADOS .....	19
Estudios hematológicos .....	19
Estudios moleculares .....	19
DISCUSIÓN.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	24

## Índice de Cuadros

CUADRO 1 .....	28
CUADRO 2.....	29
CUADRO 3.....	29
CUADRO 4.....	30
CUADRO 5.....	30
CUADRO 6.....	31
CUADRO 7.....	31
CUADRO 8.....	32
CUADRO 9.....	32

## Índice de Tablas

TABLA 1 .....	33
TABLA 2 .....	34

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores en perros (sigla en inglés CVBDs), refieren a una gran variedad de infecciones causadas por una amplia gama de patógenos (bacterias, protozoarios, helmintos) transmitidos por artrópodos que incluyen garrapatas, moscas, flebótomos y mosquitos. La ciudad de Guayaquil (Ecuador), debido a sus características geográficas y climáticas, reúne las condiciones medioambientales óptimas que favorecen la aparición, replicación y perpetuación de vectores y por consiguiente de agentes infecciosos transmitidos por estos. En la región, sólo se conoce de la presencia de estos patógenos mediante la información de los hallazgos reportados por laboratorios veterinarios zonales y algunos trabajos realizados por estudiantes para la obtención del título de grado en Veterinaria.

Entre las principales enfermedades transmitidas por vectores en caninos de la ciudad de Guayaquil se encuentran la ehrlichiosis, la piroplasmosis y la filariosis (Carrillo, 2009; Contenido, 2010; Ruiz, 2002). La garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* es un vector importante de ciertas especies de piroplasmas (e.g. *Babesia vogeli*) y de rickettsias (e.g. *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*) que afectan al perro en muchas regiones del mundo (Dantas-Torres, 2008). Esta garrapata se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y se diagnostica con mucha frecuencia en la clínica diaria en los perros de Guayaquil. En lo referente a la transmisión de filariosis, los vectores responsables son dípteros de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*, estando los 3 géneros presentes en el área (Alarcón, 2013 comunicación personal).

### **Ehrlichiosis Monocítica Canina**

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es producida por un microorganismo intracelular obligado denominado *Ehrlichia canis*. Este agente es una pequeña bacteria cocoide, pleomórfica y gram-negativa, que se presenta de manera intracitoplasmática en monocitos y macrófagos, en los que forma agrupamientos denominados mórulas (Harrus y col, 2011). La infección tiene distribución mundial y es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*. El microorganismo se multiplica por fisión binaria dentro de vacuolas en los fagocitos mononucleares. La ruptura de las células infectadas deriva luego en la infección de nuevas células e inflamación de los tejidos afectados. La respuesta inmune del hospedador produce además alteraciones inmunopatológicas con producción de daño en múltiples órganos y tejidos. La EMC es una enfermedad multisistémica para la que se han establecido 3 fases: *aguda*, *subclínica* y *crónica* (Shipov y col, 2008), basadas en la

aparición cronológica, signos clínicos y anormalidades clínico-patológicas. Los signos clínicos en la fase aguda ocurren de 8 a 20 días post-infección. Las manifestaciones varían considerablemente entre perros, de acuerdo con la cepa del patógeno actuante, la respuesta inmune del hospedador, el estadio de la enfermedad y la presencia de coinfecciones con otros patógenos. Los signos clínicos más comunes son letargia, inapetencia, fiebre y pérdida de peso. La replicación de los microorganismos en los tejidos linfoides está asociada a linfadenopatía generalizada y esplenomegalia. Puede ocurrir descarga óculo-nasal, edema periférico y, con menor frecuencia, hemorragias petequiales y equimosis en piel y mucosas debido a la trombocitopenia y la disfunción plaquetaria. Los signos neurológicos pueden aparecer como resultado de la inflamación o la hemorragia en meninges. Las alteraciones hematológicas en esta fase incluyen: anemia no regenerativa, trombocitopenia, proteinuria y, ocasionalmente, leucopenia leve. Los perros pueden recuperarse de manera espontánea en 2 a 4 semanas. Es posible que los perros no tratados y los tratados en forma inapropiada ingresen en la fase subclínica, que puede durar meses o años. En esta fase, los animales se ven saludables, sin embargo, es posible que el recuento plaquetario permanezca en niveles inferiores a los rangos de referencia. Los perros pueden ser portadores del patógeno de por vida, recuperarse de manera espontánea, o progresar hacia la fase crónica de la enfermedad. Esta fase se caracteriza por la presencia de alteraciones persistentes en el número de las células sanguíneas con diferentes grados de severidad. Generalmente hay nefropatía debido a glomerulonefritis, con pérdida de proteínas por depósitos de inmunocomplejos. Los hallazgos clínico-patológicos incluyen: anemia no regenerativa y trombocitopenia de manera frecuente y, en algunos casos, leucocitosis con neutrofilia y desvío a la izquierda. La mayoría de los caninos desarrollan linfopenia y, unos pocos, linfocitosis granular de moderada a marcada intensidad. También puede observarse hipoalbuminemia e hiperglobulinemia con gammapatía policlonal. La presencia de pancitopenia evidencia la forma crónica severa de la ehrlichiosis y es el resultado de una hipoplasia medular de todas las líneas celulares. La gravedad de los signos clínicos en esta fase es variable. Estos incluyen: letargia, inapetencia, hemorragias, palidez de mucosas, fiebre, pérdida de peso, linfadenopatía, esplenomegalia, disnea, uveítis anterior, desprendimiento y hemorragia retinal, poliuria-polidipsia y edemas. En algunos perros puede desarrollarse polimiositis que se manifiesta con pérdida difusa de la musculatura y tetraparesia. Las infecciones oportunistas secundarias pueden desarrollarse debido a mecanismos de inmunosupresión de diversa índole. Más raramente puede observarse plasmocitosis

medular con gammapatía monoclonal, que puede derivar en un diagnóstico oncohematológico erróneo (Sykes, 2013).

El diagnóstico de EMC puede realizarse por microscopía óptica a partir de extendidos sanguíneos coloreados, observando las estructuras morulares en los leucocitos mononucleares. Desafortunadamente la búsqueda de mórulas es exitosa solo en algunos casos, debido a que es una técnica difícil y que demanda mucho tiempo. Se puede aumentar la sensibilidad observando 1000 campos de inmersión (objetivo 100X) en frotis de capa flogística (*buffycoat*) (Harrus y col, 2011). Adicionalmente se pueden observar las mórulas en extendidos de nódulos linfáticos y médula ósea (Mylonakis y col, 2003).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos de tipo IgG contra *E. canis* es considerada la técnica “*gold standard*” para determinar la exposición al microorganismo. La detección de IgM no es considerada un indicador confiable de exposición a *E. canis* debido al inconsistente desarrollo de este tipo de inmunoglobulina en el curso de la enfermedad (Mc Bride y col, 2003). Los títulos iguales o superiores a 40 (IgG) son indicativos de exposición a *E. canis*. En infecciones agudas se recomienda analizar una segunda muestra con un lapso de 7 a 14 días para evidenciar seroconversión. En este caso, un aumento de 4 veces en los títulos de anticuerpos es sugestivo de una infección activa. Los anticuerpos del tipo IgG pueden permanecer detectables durante varios meses e incluso años después del tratamiento (Bartsch y col, 1996).

Las pruebas moleculares son altamente sensibles para detectar el ADN de *E. canis*. En infecciones experimentales, la detección en muestras de sangre se puede lograr tan pronto como 4-10 días después de la inoculación (Iqbal et al, 1994).

## **Piroplasmosis**

La piroplasmosis canina es una infección producida principalmente por protozoarios hemoparásitos de los géneros *Babesia* y *Theileria*, que afecta a los caninos domésticos y salvajes de todos los continentes. Es una enfermedad transmitida por garrapatas que afecta principalmente los eritrocitos y se caracteriza por producir fiebre, anorexia, anemia, trombocitopenia y esplenomegalia, llegando a ser fatal en algunos casos. La infección puede desaparecer o cursar de modo asintomático pasando a la cronicidad con un nivel mínimo de protozoarios circulantes. Se han reportado varias especies de *Babesia* y *Theileria* que afectan a los perros. Los protozoos pertenecientes a

ambos géneros se multiplican asexualmente (merogonia) en los hospedadores vertebrados. En el género *Babesia*, esta multiplicación tiene lugar directamente en los glóbulos rojos mientras que en el género *Theileria* inicialmente se multiplican en los linfocitos circulantes (Birkenheuer y col, 2004; Uilenberg, 2006).

En base al tamaño de los merozoítos intraglobulares se clasifican en “piroplasmas grandes” (>2,5 µm), que se corresponden con las especies *B. canis*, *B. vogeli* y *B. rossi*, y los “piroplasmas pequeños” (<2,5 µm) que se corresponden con *B. gibsoni* y *B. conradae*. Hasta hace algunos años, los “piroplasmas grandes” eran consideradas subespecies de *B. canis*, aunque las marcadas diferencias a nivel molecular, especificidad de hospedadores y patogenicidad refuerzan la idea actual de que son especies diferentes. Recientemente, se ha identificado la presencia de *Theileria annae* en cánidos de España. Este protozooario presenta formas intraglobulares pequeñas (<2,5 µm), ovales o circulares (Zahler y col, 2000; Camacho y col, 2001). El Cuadro 1 resume las principales características de las especies de piroplasmas descritas hasta el momento en el perro a nivel mundial.

El ciclo de vida de *Babesia* spp. es indirecto. Los esporozoítos son inoculados al torrente sanguíneo de hospedadores vertebrados con mínimas cantidades de saliva durante la alimentación de una garrapata infectada. Después de invadir los eritrocitos, los esporozoítos se diferencian en trofozoítos que se dividen asexualmente (merogonia) en dos o más merozoítos. Eventualmente salen del eritrocito e invaden nuevas células, continuando con el ciclo de replicación en el hospedador. Unos pocos merozoítos detienen su división y se transforman en gamontes o pregametocitos. Las etapas de gametogonia y esporogonia tienen lugar en la garrapata. Cuando los gamontes son captados por una garrapata que se alimenta de un hospedador infectado, se diferencian a gametas (cuerpos radiales) en su intestino. La reproducción sexual ocurre cuando las gametas se fusionan para formar un cigoto diploide. Estos cigotos se dividen por meiosis dando lugar a ooquistos haploides móviles que acceden a la hemolinfa invadiendo y continuando su replicación en varios órganos de la garrapata incluyendo las glándulas salivales. Luego de un ciclo final de multiplicación y diferenciación (esporogonia), los ooquistos se transforman en esporozoítos (esporooquistos), que infectan a nuevos hospedadores vertebrados. En algunas especies del género *Babesia*, los ooquistos pueden alcanzar los ovarios de la garrapata hembra e infectar sus huevos. De este modo la infección puede transmitirse de una generación a otra. Este mecanismo se denomina transmisión transovárica (Schnittger y col, 2012) y tiene relevancia cuando la especie de



garrapata que transmite la infección, desarrolla toda su etapa parasitaria en un mismo hospedador (e.g *Rhipicephalus microplus* en el ganado bovino). En el caso de *R. sanguineus* (cuyo desarrollo puede producirse en 3 hospedadores diferentes), el mecanismo de transmisión del agente se realiza de manera transestadial (de larva a ninfa o de ninfa a adulto). Las ninfas pueden transmitir la infección si se infectaron siendo larvas y los adultos si se infectaron siendo ninfas.

Las manifestaciones clínicas de la babesiosis canina varían según la especie del agente implicado y la presencia de coinfección con otros patógenos, además de la edad y el estado inmunitario del paciente.

*Babesia canis*, transmitida por la garrapata *Dermacentor reticulatus*, causa una enfermedad leve a severa, cuya parasitemia es por lo general baja y no necesariamente se relaciona con la severidad de la enfermedad. Los signos clínicos en la fase aguda son fiebre, anorexia, ictericia, letargia y deshidratación. Entre las modificaciones clínico-patológicas podemos encontrar: trombocitopenia leve a severa, neutropenia e hiperfibrinogenemia. También puede observarse anemia normocítica y normocrómica no regenerativa, de magnitud leve a moderada y, en algunos casos, anemia hemolítica y hemoglobinuria (Solano Gallego y col, 2011).

*Babesia vogeli*, transmitida por *R. sanguineus*, usualmente se presenta de manera subclínica, pudiendo desarrollar una enfermedad leve a moderada en algunos perros. En los cachorros de 3 a 4 meses de edad, la presentación clínica de la enfermedad es más severa, pudiendo desarrollarse anemia hemolítica con desenlace fatal. Las alteraciones hematológicas más frecuentes son: trombocitopenia, leucopenia, leucocitosis, anemia no regenerativa y anemia hemolítica en cachorros (Solano-Gallego y col, 2008).

*Babesia rossi* fue descrita hasta el momento solamente en Sudáfrica, Nigeria y Sudan, es transmitida por la garrapata *Haemophysalis elliptica* (syn. *H. leachi*). Los perros infectados con *B. rossi* pueden presentar manifestaciones clínicas que han sido categorizadas en dos formas de presentación, una no complicada y con bajo compromiso del sistema circulatorio (generalmente con buen pronóstico), manifestando fiebre, letargia, anorexia, membranas mucosas pálidas y esplenomegalia. Entre las anormalidades clínico-patológicas relacionadas con esta forma, puede haber anemia leve a moderada, trombocitopenia, leucocitosis, hiperbilirrubinemia y hematuria. La otra forma de presentación es la denominada complicada, en la cual se evidencia un compromiso importante del sistema circulatorio (con pronóstico malo). Esta forma se manifiesta con falla renal aguda (anuria), ictericia, hipotensión, síndrome de diestres respiratorio agudo,

vómito, diarrea, pancreatitis, mialgia, ascitis, edema pulmonar, signos neurológicos y shock. Las anormalidades clínico-patológicas más frecuentes son: desequilibrio ácido-base, azotemia renal, coagulopatías, anemia hemolítica inmunomediada, hipoglucemia e hipercalcemia (Jacobson, 2006). La elevada patogenicidad de *B. rossi* podría explicarse debido a la presencia de una fosfoproteína polimórfica localizada en la superficie de glóbulos rojos infectados, que se ha caracterizado y denominado recientemente BrEMA1 por sus siglas en inglés (*Babesia rossi* erythrocyte membrane antigen 1). A esta proteína se le atribuye la virulencia en la babesiosis canina por *B. rossi* ya que, en las especies menos patogénicas como *B. canis* y *B. vogeli*, no ha sido detectada (Matjila y col, 2009).

Desde hace muchos años en el sur de Brasil, y más recientemente en Uruguay y en el noreste de Argentina se diagnostica frecuentemente en perros la infección con otro piroplasma de tamaño grande denominado *Rangelia vitalii*. Este parásito afecta, además de los eritrocitos, los leucocitos y las células endoteliales de los capilares sanguíneos, causando una enfermedad hemorrágica denominada *namviubú* (que significa orejas sangrantes en guaraní) (Eiras y col, 2014; França y col, 2014; Soares y col, 2015).

Entre los piroplasmas de tamaño pequeño, *B. gibsoni* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo endémico en algunas regiones de Asia y EEUU, pudiendo transmitirse por la picadura de la garrapata *R. sanguineus*. Además, se ha resaltado la importancia de la transmisión horizontal mediante la inoculación de los parásitos mediante la mordedura en peleas de perros (Irwin, 2009). En la babesiosis por *B. gibsoni*, son comunes las infecciones crónicas y la presentación puede ser subclínica o asociada a pérdida de peso y debilidad. En muchas regiones son comunes las infecciones subclínicas en los perros de raza Pit Bull Terrier debido al mecanismo de transmisión horizontal (Birkenheuer y col, 2005). Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen fiebre, letargia, palidez de mucosas, ictericia, linfadenomegalia, esplenomegalia y pérdida de peso. Los hallazgos de laboratorio comprenden: anemia regenerativa (de tipo hemolítica inmunomediada), hiperbilirrubinemia, hemoglobinuria, bilirrubinuria y trombocitopenia.

*Babesia conradae*, descrita en California (EEUU), es una especie más virulenta que *B. gibsoni*, resultando en mayor parasitemia, anemia más marcada y mayor tasa de mortalidad. La enfermedad se caracteriza por presentar letargia, palidez de mucosas, vómitos y linfadenomegalia. Las alteraciones clínico-patológicas incluyen: anemia hemolítica inmunomediada y trombocitopenia.

*Theileria annae* (*B. microti-like piroplasm*) es un piroplasma pequeño descrito hace pocos años en el noroeste de España. Las manifestaciones clínicas más comunes reportadas en perros infectados son: debilidad, fiebre, letargia, taquicardia, taquipnea y hemoglobinuria. Las modificaciones hematológicas incluyen: moderada a severa anemia regenerativa, trombocitopenia, azotemia y proteinuria.

El diagnóstico de piroplasmosis puede realizarse de distintas maneras: 1- observación directa de extendidos sanguíneos, 2- pruebas serológicas y 3- técnicas moleculares (PCR).

La detección de piroplasmas en los extendidos sanguíneos es la técnica de diagnóstico estándar. Este método es confiable en presencia de una moderada o alta parasitemia. El diagnóstico de infecciones crónicas o de caninos portadores sigue siendo un reto para la evaluación microscópica ya que las parasitemias bajas o intermitentes son de muy difícil observación aún para el profesional más entrenado.

Las técnicas serológicas pueden indicar una infección pasada o presente persistente. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos de tipo IgG, es la prueba serológica más comúnmente utilizada. Sin embargo, puede existir reacción cruzada entre las diferentes especies de *Babesia* (Vercammen, 1995).

Las técnicas moleculares son más sensibles y se emplean frecuentemente en el diagnóstico específico de piroplasmosis. Resultan particularmente útiles para la detección de perros con parasitemia baja y para la identificación de las distintas especies (Jefferies y col., 2007).

## **Filariosis**

La dirofilariosis canina en América es producida principalmente por el nematode *Dirofilaria immitis* que, en su forma adulta, se localiza principalmente en las arterias pulmonares y en el ventrículo derecho de los perros infectados, produciendo un proceso denominado “enfermedad del gusano del corazón” (*heartworm disease*). El parásito es transmitido por mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*. En general, y dependiendo de la región, la infección guarda relación con la raza, el sexo y la edad. La prevalencia suele ser mayor en machos y en perros de raza grande y pelo corto. Respecto de la edad, los perros más afectados se encuentran entre los 4 y 8 años de edad, aunque puede ser diagnosticada eventualmente en perros menores de 1 año (pero mayores de 6 meses debido al período prepatente relativamente largo), así como en animales geriátricos (Vezzani y col, 2011).

El ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* inicia cuando el mosquito se infecta al alimentarse con sangre de un perro con microfilarias circulantes (larva 1). Una vez ingeridas, las microfilarias migran desde el abdomen del mosquito a los túbulos de Malpighi donde desarrollan hasta su estado infectante de larva 3 (L3) en 10 a 14 días con una temperatura ambiente de 27°C. La L3 migra hasta las piezas bucales del vector y se encuentra lista para ser inoculada cuando el mosquito se alimente en otro hospedador. Cada mosquito puede inocular entre 1 y 3 larvas por picadura. El desarrollo en el hospedador se inicia con las L3 en el tejido subcutáneo del perro, donde mudan rápidamente a L4. En los siguientes 50 a 70 días, las L4 permanecen en el tejido subcutáneo y entre las fibras musculares. La muda de L4 a pre-adulto (sexualmente inmaduro) ocurre alrededor de los 2 meses post infección (PI), para luego penetrar en una vena sistémica y ser transportados por el torrente sanguíneo hasta las arterias pulmonares donde se fijan. Durante los 3 meses siguientes, los pre-adultos maduran y alcanzan su localización final en las arterias pulmonares principales y las cavidades del corazón. La microfiliaremia aparece entre los 6 y 9 meses PI (Montoya y col, 2012).

Muchos perros diagnosticados como positivos mediante las técnicas de rutina a menudo son asintomáticos. Los animales con la enfermedad clínicamente establecida muestran un historial con fatiga, dificultad para respirar o disnea durante el ejercicio, síncope, tos, hemoptisis, pérdida de peso, o síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Los hallazgos en la exploración física pueden ser normales en pacientes con una enfermedad temprana o leve. El cuadro grave frecuentemente se asocia con pobre condición física, taquipnea o disnea, distensión o pulsaciones en la vena yugular, ascitis y otras evidencias de ICC del lado derecho (Ware, 2010). El cuadro 2 resume los distintos grados de enfermedad junto con los signos clínicos.

Los caninos pueden verse afectados por otros filáridos como *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema* (*syn. Dipetalonema*) *reconditum* y *A. dracunculoides*. Los adultos de éstos filáridos se ubican en tejidos subcutáneos y cavidad peritoneal y liberan microfilarias que circulan en el torrente sanguíneo. Por este motivo, no basta con el hallazgo de microfiliaremia para el diagnóstico de dirofilariosis cardiopulmonar. Ante la sospecha clínica o ante el hallazgo hematológico de microfilarias circulantes, lo recomendable es realizar una correcta identificación de especie, debido a la importancia en la patogenicidad de *Dirofilaria immitis*.

El diagnóstico de filariosis puede realizarse por distintos métodos: 1-búsqueda de microfilarias en “gota gruesa”; 2- observación de microfilarias en el tubo de hematocrito

microcapilar (Test de Woo); 3- test de Knott modificado; 4- método de filtración; 5- detección de antígeno uterino de las hembras adultas; 6- coloración histoquímica y 7- estudios moleculares.

La observación de microfilarias en “gota gruesa”, es un método sencillo que se basa en la observación microscópica directa de una gota de sangre entre porta y cubreobjetos con el objetivo de 10x. Puede verse los movimientos de las microfilarias entre los eritrocitos. Por lo general, las microfilarias de *Dirofilaria immitis* son muy móviles, con movimientos ondulantes y no progresivos. Las microfilarias de *Acanthocheilonema reconditum* presentan movimientos rectilíneos y progresivos.

El test de Woo consiste en centrifugar la sangre con anticoagulante a 10000 rpm en un tubo capilar de microhematocrito (aprox. 80 µl) para luego observarlo al microscopio con el objetivo de 10x. Las microfilarias se observan fácilmente debido a su movilidad en la interfase entre la capa flogística y la fracción plasmática.

El test de Knott modificado consiste en producir la lisis de los eritrocitos de 1 ml de sangre con una solución de formol al 2%, con posterior centrifugación y observación del sedimento al microscopio. Se utiliza Azul de metileno como contraste. La muerte de las microfilarias con la solución formolada, confiere a los parásitos una morfología característica que puede utilizarse como orientación en la identificación.

El método de filtración se realiza mediante la destrucción o hemólisis de las distintas células sanguíneas de hasta 5 ml de sangre con una solución de carbonato sódico al 0,1%. Luego, se realiza la filtración del material a través de una membrana con poros de 3 µm de diámetro para concentrar y posteriormente teñir y observar las microfilarias al microscopio.

Estas últimas 2 técnicas, permiten la evaluación morfológica de las microfilarias y han sido usadas como referencia en muchas publicaciones. El hallazgo y observación de microfilarias con las técnicas antes mencionadas, debe complementarse con otras pruebas específicas para diferenciar las diferentes especies de filáridos que pueden afectar a los perros.

La detección de antígeno uterino se realiza por ELISA o Inmunocromatografía y consiste en la detección específico de antígenos circulantes eliminado por las hembras adultas de *Dirofilaria immitis*.

El método histoquímico, denominado también Test de fosfatasa ácida (FAC), se emplea para identificar la especie de filárido mediante el estudio de la distribución

somática de actividad de fosfatasa ácida en las microfilarias circulantes (Montoya y col, 2012).

Por último, las técnicas moleculares son más sensibles y se emplean para identificar a los distintos tipos de filáridos.

Hasta el momento, las infecciones asociadas a CVBDs en Guayaquil no han sido correctamente caracterizadas y reportadas, motivo por el que muchas de estas enfermedades infecciosas son usualmente sub-diagnosticadas o diagnosticadas de manera errónea. La EMC ha sido diagnosticada durante mucho tiempo por los veterinarios clínicos de la zona y parece ser la rickettsiosis de mayor relevancia en caninos del área urbana de la ciudad. Sumado a esto, en los laboratorios veterinarios es usual el hallazgo de estructuras tipo mórula en el interior de los leucocitos mononucleares (linfocitos y monocitos) (Olaya Martínez, observación personal). Por otro lado, los hallazgos hematológicos coinciden con la observación de piroplasmas intraeritrocitarios de más de 2,5  $\mu\text{m}$  y se presume que el género *Babesia* se encuentra presente en la zona de estudio, aunque se desconocen las especies implicadas (Olaya Martínez, observación personal). Por último, los casos de filariosis presentes en la zona de estudio son generalmente atribuidos a *Dirofilaria immitis* como agente causal, debido a la presencia de vectores competentes y del hallazgo periódico de microfilarias en los perros que, en general, se asocian a resultados positivos para la detección de antígeno específico de esta especie (Olaya Martínez, observación personal). Se desconoce la existencia de otras especies de filáridos en la zona.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Caracterizar los patógenos sanguíneos transmitidos por vectores y las alteraciones ocasionadas en el hemograma en caninos de la ciudad de Guayaquil.

### **Objetivos específicos**

- Registrar el hallazgo de patógenos transmitidos por vectores detectables en muestras de sangre de perros provenientes de la ciudad de Guayaquil durante el período de Enero-Febrero del 2013.
- Determinar la tasa de infección para cada patógeno transmitido por vectores observado.
- Caracterizar las alteraciones del hemograma observadas en los caninos infectados, principalmente mediante evaluación del número y la morfología de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas.
- Identificar mediante estudios moleculares los patógenos observados en las técnicas hematológicas.

## **HIPÓTESIS**

La tasa de infección de patógenos transmitidos por vectores detectables en el hemograma en perros de Guayaquil es similar a lo reportado en otros países sudamericanos.

La infección con patógenos transmitidos por vectores detectables al hemograma en perros de Guayaquil produce alteraciones morfológicas y numéricas de los eritrocitos, leucocitos o plaquetas.

En las muestras de sangre de perro de Guayaquil positivas al hemograma, pueden evidenciarse por técnicas moleculares al menos una especie de cada grupo de patógenos transmitidos por vectores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se emplearon 500 muestras de sangre con anticoagulante (EDTA), que ingresaron durante el período comprendido entre el 2 de Enero hasta el 28 de Febrero de 2013 al servicio de diagnóstico hematológico del laboratorio DIAGNOVET, ubicado en las calles Lorenzo de Garaycoa #2505 de la ciudad de Guayaquil, Ecuador. Las 500 muestras seleccionadas, a las que se les realizó hemograma en el mencionado laboratorio, provenían de caninos con propietario que residen en el área urbana de la ciudad y que fueron remitidas por médicos veterinarios con fines diagnósticos diversos.

Los criterios de selección de las muestras fueron los siguientes:

- Adecuada cantidad y calidad de la muestra, es decir, un mínimo de 1 ml y libre de microcoágulos.
- Presencia de orden de ingreso completa, es decir, que incluya la información de la mascota (nombre, raza, sexo, edad) y del propietario (nombre y sector en el que reside) para evitar repeticiones.
- Muestreo aleatorio previo a la realización del hemograma.

### **Estudios hematológicos**

La medición de los parámetros del hemograma de las 500 muestras se realizó con procedimientos manuales y automatizados.

Los procedimientos manuales incluyeron: 1. Observación de la interfase del capilar microhematocrito para la detección de microfilarias (Test de Woo); 2. Medición de sólidos totales plasmáticos mediante refractometría; 3. Recuento de reticulocitos en los pacientes anémicos (expresado como índice reticulocitario); 4. Observación de los extendidos sanguíneos coloreados con May Grünwald-Giemsa (Merck, Alemania), para la obtención de la fórmula leucocitaria, la descripción morfológica de las células sanguíneas y la búsqueda microscópica de patógenos transmitidos por vectores (mórulas de *Ehrlichia* spp., merozoitos de *Babesia* spp. y microfilarias). Para esto último se evaluaron 100 campos microscópicos de 1000X en la zona de monocapa.

Los procedimientos automatizados se realizaron en el contador hematológico Abacus Junior Vet (Diatron, Austria) e incluyeron: recuentos de los distintos tipos de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos, plaquetas), medición de hemoglobina, hematocrito y obtención de índices eritrocitarios.



Las muestras detectadas como positivas a la presencia de microfilarias mediante el test de Woo fueron testeadas con una prueba inmunocromatográfica (FASTest HW, Megacor, Austria) para la detección de antígeno específico de *D. immitis*.

### **Estudios moleculares**

Las muestras con resultados positivos a la observación de patógenos transmitidos por vectores en los estudios hematológicos se separaron para la realización de los estudios moleculares. Para ello, se fraccionaron 300 microlitros de sangre entera acondicionada en tubos de 1,5 ml a -18°C hasta su remisión al laboratorio de Inmunoparasitología, FCV-UNLP en junio de 2013 (Autorización de importación SENASA, nota CIP N° 0327/2013).

**Extracción de ADN:** se realizó la extracción de ADN usando el Kit comercial Wizard genomics (Promega, USA), usando 300 µl de sangre como muestra y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se repitió 3 veces el paso de lisis de los eritrocitos a fin de obtener un *pellet* bien limpio. Los pasos de centrifugación se realizaron a 15000 x g durante 30 segundos. Para la lisis de membranas nucleares se incubó con el buffer correspondiente a 37°C durante 30 minutos en baño seco. Las muestras se resuspendieron en 100 µl de buffer de hidratación, se colocaron a 4°C *overnight* para la rehidratación y luego a -20°C hasta su utilización. En cada rutina de extracción se incorporó una muestra de control de proceso (solo soluciones del kit de extracción).

**Estudios moleculares para *Ehrlichia/Anaplasma*:** El ADN extraído de las muestras positivas a la presencia de mórulas al microscopio fue amplificado mediante PCR y posterior secuenciación. Se utilizaron los *primers* descritos por Parola y col. (2000) que permiten amplificar un fragmento de 345 pb del gen 16S del ARNr de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Los detalles de la técnica se encuentran descritos en el cuadro 3.

**Estudios moleculares para piroplasmas (*Babesia/Theileria*):** el ADN de las muestras positivas a piroplasmas mediante microscopía, fueron sometidas a la amplificación mediante *Nested*- PCR y las que resultaron positivas fueron cortadas con enzimas de restricción (RFLP) para identificar la especie. Adicionalmente, se seleccionaron muestras positivas para su secuenciación a fin de comparar las secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBank. Se utilizaron los *primers* externos e internos descritos por Jefferies y col. (2007) que permiten amplificar fragmentos del gen 18S rRNA de los géneros *Babesia* y *Theileria*. Del ADN extraído se emplearon 2 µl que se agregaron a 23 µl de *master mix*, que correspondió con: 1U de Taq Polimerasa; 200 µM

de cada dNTP; 0,5  $\mu$ M de los *primers forward* y *reverse*; 2,5  $\mu$ l de BSA (20  $\mu$ g/ml) y 2,5  $\mu$ l de PCR *buffer* 10x y 1,25  $\mu$ M de  $MgCl_2$ . Se utilizó el programa descrito en el cuadro 4. Para el ciclo interno, se preparó el *mix* con las mismas condiciones antes mencionadas, como muestra se usó 1  $\mu$ l del amplificado con *primers* externos y se siguió el mismo protocolo pero con 62 °C como temperatura de *annealing* (cuadro 5).

El producto final de aproximadamente 800 pb (de 781 a 843 según la especie) se reveló mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción SYBR-Safe y observación en transiluminador de luz azul (Invitrogen). Los amplificados internos fueron sometidos a restricción usando 3  $\mu$ l del mismo y cortados con la enzimas HinfI (0,4  $\mu$ l), usando buffer R (Fermentas), en tubos eppendorf de 0,5 ml y en baño seco a 37°C durante 1 hora. Por otro lado, se sometieron los mismos productos a la doble digestión con las enzimas HincII y BslI (0,3  $\mu$ l de cada una) usando buffer Tango (Fermentas) durante 1 hora a 37 °C y luego 1 hora a 55 °C. Los productos de restricción fueron evidenciados como se describiera anteriormente en geles de agarosa al 2,5%. Los productos y patrones de restricción esperados para cada especie de piroplasma se muestran en los cuadros 6 y 7 (Jefferies y col, 2007).

**Estudios moleculares en filáridos:** el ADN extraído de las muestras positivas al Test de Woo fue amplificado mediante PCR y posterior secuenciación. Se utilizaron los *primers* descritos por Rishniw (2006) que permiten la amplificación de la región ITS1 del cromosoma de diferentes especies de filáridos. Del ADN extraído se emplearon 2  $\mu$ l que se agregaron a 23  $\mu$ l de *master mix* que comprendió: 1U de Taq Polimerasa; 200  $\mu$ M de cada dNTP; 0,5  $\mu$ M de los primers *forward* y *reverse*; 2,5  $\mu$ l de BSA (20  $\mu$ g/ml) y 2,5  $\mu$ l de PCR *buffer* 10x y 1,25  $\mu$ M de  $MgCl_2$ . La programación se encuentra descrita en el cuadro 8. El producto de amplificación obtenido varía con la especie de filárido (cuadro 9).

Todas las rutinas de PCR se llevaron a cabo con controles positivos y negativos específicos (y control de extracción) como así también una muestra sin ADN (NTC= *No Template Control*) en un termociclador (THERMO electron corporation).

**Secuenciación:** los productos de amplificación de las técnicas de PCR empleadas se purificaron con el kit comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron enviados para su secuenciación a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (INTA- Castelar). La secuenciación se llevó a cabo en ambos sentidos (*forward* y *reverse*) utilizando los mismos *primers* de amplificación de cada PCR específica. Las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron utilizando el programa GENEIOUS (versión R7, 7.1.5). Las

secuencias consenso obtenidas se compararon con otras publicadas en el GenBank usando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## RESULTADOS

### Estudios hematológicos

De las 500 muestras evaluadas en el estudio, 40 (8%) resultaron positivas a la presencia de patógenos transmitidos por vectores en las técnicas hematológicas utilizadas (Test de Woo y observación de extendidos sanguíneos) (Tabla 1). Basándonos en la observación de los extendidos sanguíneos, se encontró que 11 muestras (2,2%) presentaban estructuras morulares compatibles con *Ehrlichia* spp. en los leucocitos mononucleares (linfocitos y monocitos). En 25 muestras (5%) se observó la presencia de merozoitos de piroplasmas grandes (>2.5 µm) intraeritrocitarios. Por último, en 4 muestras (0,8%) se evidenciaron microfilarias en la interfase del capilar microhematocrito. No se registraron coinfecciones.

Las alteraciones hematológicas detectadas se resumen en la tabla 2. De los 11 perros identificados con mórulas de *Ehrlichia* spp., 7 (63,9%) registraron anemia no regenerativa y 1 (9,1%) anemia regenerativa. En 4 (36,3%) se registró leucopenia y en los 11 animales (100%) trombocitopenia. La policromasia se evidenció en 2 casos (18,2%), en 5 (45,5%) se observaron macroplaquetas y en 8 (72,7%) monocitos reactivos (monocitos de gran tamaño e intensamente vacuolados). En las 25 muestras detectadas con piroplasmas, las alteraciones hematológicas cuantitativas más frecuentes fueron: anemia no regenerativa en 12 casos (48%); leucopenia en 9 (36%) y trombocitopenia en 24 (96%). Entre las alteraciones cualitativas, se evidenció policromasia en 16 casos (64%), presencia de monocitos reactivos en 5 (20%) y macroplaquetas en 9 (36%).

De las 4 muestras positivas al Test de Woo, solo en una (25%) se registró anemia leve y trombocitopenia moderada, adicionalmente 3 (75%) de las muestras dieron positivas al test inmunocromatográfico para la detección de antígeno específico de *Dirofilaria immitis*.

### Estudios moleculares

Las 11 muestras con estructuras morulares observadas en los extendidos sanguíneos resultaron positivas a la técnica de PCR para *Ehrlichia/Anaplasma*. Las secuencias consenso obtenidas revelaron los siguientes resultados cuando se compararon con las secuencias reportadas en el GenBank mediante el análisis de

BLAST: las 11 secuencias tuvieron 99-100% de identidad con *Ehrlichia canis* (KJ659037.1 y otras).

Las 25 muestras con piroplasmas al frotis resultaron positivas a la *Nested PCR*. El corte con enzimas de restricción fue coincidente con el patrón descrito para *Babesia vogeli* en todas las muestras. De estas, se secuenciaron 3 y las secuencias obtenidas tuvieron 100% de identidad con *Babesia vogeli* (HM590440 y DQ297390 y otras).

Por último, las 4 muestras con microfilarias resultaron positivas a la PCR para filáridos empleada. Las bandas obtenidas en este último caso se correspondieron con aquellas descritas para *D. immitis* (3 muestras, aprox. 540 pares de bases) y *A. reconditum* (1 muestra, aprox. 580 pares de bases). Los resultados de la secuenciación fueron: 3 secuencias con 99-100% de identidad a *Dirofilaria immitis* (JX866681, KF273905 y FJ263465) y una muestra, 100% de identidad con *Dipetalonema (Acanthocheilonema) reconditum* (AF217801).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo representa el primer estudio de caracterización e identificación molecular de *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Dirofilaria immitis* y *Acanthocheilonema reconditum* en perros de la ciudad de Guayaquil, Ecuador. Estas cuatro especies forman parte de un grupo de patógenos transmitidos por vectores que afectan a los caninos en muchas regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo.

En Sudamérica, la presencia de estos agentes se ha confirmado (principalmente en los últimos años) en varios países. La piroplasmosis canina por *B. vogeli* se encuentra reportada en Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela (Eiras y col, 2008; Passos y col, 2005; Vargas y col, 2012; Criado-Fornelio y col, 2007) aunque es probable que se halle presente en todos los países de la región debido a las características cosmopolitas del vector *R. sanguineus*. En este estudio, la tasa de infección obtenida para piroplasmosis fue del 5%; dato similar al 4% previamente reportado en el país por Contento en 2010. En comparación con otros países de Sudamérica, la tasa de infección es mayor al 0,2% reportado por Eiras y col (2008) en Argentina y al 2,2% reportado por Criado-Fornelio (2007) en Venezuela, aunque inferior al 8,1% reportado por Santos y col (2009) en Brasil, y similar al 5,5% reportado por Vargas y col (2012) en Colombia. Las diferencias obtenidas podrían estar influenciadas por las condiciones climáticas de cada país, pero también debe considerarse el método diagnóstico utilizado, ya que la sensibilidad de las

técnicas moleculares es mucho mayor a la sensibilidad de las técnicas hematológicas convencionales (frotis sanguíneo). En el presente trabajo, el patrón de restricción resultante para todas las muestras fue compatible con *Babesia vogeli*. Este resultado fue confirmado por secuenciación de 3 productos de la amplificación parcial (aprox. 800 pares de bases) del gen 18S ARNr de las muestras positivas a piroplasmas en el hemograma. Hasta el momento, este sería el único piroplasma identificado molecularmente en perros de Guayaquil.

La EMC producida por *E. canis* fue reportada en varios países de América del sur como Argentina, Colombia y Perú (Eiras y col, 2013; Vargas y col, 2012; Vinasco y col, 2007). La tasa de infección (mediante la observación de mórulas de *Ehrlichia* spp. al microscopio) en el presente estudio fue significativamente baja (2,2%) respecto del 26% reportado previamente en la misma zona (Carrillo, 2009) y levemente inferior al 4,3% reportado en Colombia por Vargas y col (2012). El análisis de las 11 secuencias obtenidas por amplificación del gen 16S permitió atribuir a *E. canis* como causal de la EMC en los perros del área de estudio. Estos hallazgos constituyen la primera caracterización molecular del patógeno en Ecuador y se corresponde con otros trabajos recientes desarrollados en la región.

La tasa de infección para los filáridos fue del 0,8%, inferior al 8% previamente reportado en Guayaquil por Ruiz en el 2002 mediante técnicas de detección de antígeno circulante. Esta diferencia reflejaría un descenso en la prevalencia en los últimos años, aunque podría ser también atribuida a diferencias en los métodos diagnósticos empleados. En el país vecino Perú, la tasa de infección detectada empleando el método de microcapilar (test de Woo) y Knott modificado fue del 0,8% (Acuña y Chavez, 2002), idéntica a la detectada en el presente estudio. En el mismo trabajo, los autores reportaron una tasa de 4,7% empleando el método de ELISA. Por lo antes expuesto se entiende que los kits de detección de antígeno circulante son más sensibles que la detección de microfilarias. Esta hipótesis ha sido previamente confirmada por otros autores (Vezzani y col, 2011). Los 3 casos confirmados como *D. immitis* mediante PCR y secuenciación, resultaron positivos a la detección de antígeno específico. En el caso restante, se detectaron microfilarias con el test de Woo pero la detección de antígeno resultó negativa. Adicionalmente, la amplificación mediante PCR y secuenciación confirmaron la presencia de *A. reconditum* en esta muestra. Estos hallazgos confirman la presencia de *D. immitis* y *A. reconditum* en la ciudad de Guayaquil y reafirman la necesidad de combinación de técnicas específicas para arribar a un diagnóstico certero.

En cuanto al análisis de las alteraciones hematológicas cuantitativas observadas en los perros de nuestro estudio, se puede concluir que la anemia no regenerativa es un hallazgo de importancia que se presentó con mucha frecuencia en los casos de piroplasmosis (48%) y ehrlichiosis (63%). Los leucocitos no mostraron modificaciones cuantitativas relevantes y solo merece destacarse la presencia de monocitos activados. Este último hallazgo junto a la trombocitopenia, fueron las modificaciones hematológicas más frecuentes y constantes en el presente estudio. La presencia de monocitos activados fue escasa en los casos de piroplasmosis (18,2%), en relación a lo encontrado en la ehrlichiosis, llegando a estar presente en el 72,7% de los casos. No se hallaron monocitos activados en las muestras que evidenciaron microfilarias. La trombocitopenia estuvo presente en el 96% de los casos de piroplasmosis, en todos los casos de ehrlichiosis y en uno de los cuatro casos de filariosis. Esta información es similar a la reportada por Eiras y col (2013) y Santos y col (2009) en lo referente a la disminución en el número de plaquetas como indicador frecuente en la ehrlichiosis monocítica canina. La trombocitopenia podría establecerse como una variable o indicador de la presencia de alguno de los agentes causales de CVBDs en los perros de la zona de estudio.

Las alteraciones hematológicas cualitativas más relevantes fueron la policromasia, y la presencia macroplaquetas. La policromasia resultó una variable frecuente en los casos de piroplasmosis (64%). Este dato sugiere que, en los casos con anemia no regenerativa (48%), la respuesta medular fue insuficiente para corregir el déficit eritrocitario en el momento del diagnóstico. La presencia de macroplaquetas fue detectada en el 36% de los casos de piroplasmosis, 45,5% de los casos de ehrlichiosis y 25% de los casos de filariosis. Esto permite presumir que, a pesar de ser un indicador constante en los 3 patógenos encontrados, no se presenta con una frecuencia importante, a excepción de la ehrlichiosis donde las plaquetas se ven alteradas también de manera cuantitativa. Los monocitos activados constituyen una anormalidad cualitativa de los monocitos circulantes normales además de ser un desorden cuantitativo como se mencionó más arriba. La presencia de estas células podría también constituir un indicador confiable de la infección con algunos de estos patógenos, pero se necesitan estudios adicionales al respecto que permitan conocer si existe correlación entre la presencia de estas células y las CVBDs (Eiras y col, 2013).

Si bien la presencia de EMC, piroplasmosis y filariosis en la zona de estudio es conocida a nivel local por los veterinarios desde hace muchos años, estas enfermedades no habían sido documentadas hasta el nivel de la especie implicada en la zona de

estudio. El presente trabajo representa la primera caracterización molecular de agentes transmitidos por vectores en Ecuador.

## BIBLIOGRAFÍA

Acuña P, Chávez A. Determinación de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en los distritos de San Martín de Porres, Rimac y Cercado de Lima. Rev Inv Vet Perú 2002. 13, 108–110.

Alarcón J. Coordinador de Entomología del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM – Ecuador).

Bartsch RC, Greene RT. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. J Vet Intern Med 1996;10(4):271-4.

Birkenheuer AJ, Neel J, Ruslander D, Levy MG, Breitschwerdt EB. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. Vet Parasitol 2004; 124(3-4):151-60.

Camacho AT, Pallas E, Gestal JJ, Guitian FJ, Olmeda AS, Goethert HK, y col. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. Vet Rec 2001; 149(18):552-5.

Carrillo C. “Determinación de *Ehrlichia spp.* en sangre capilar auricular y sangre periférica cefálica en perros atendidos en la clínica veterinaria de la Universidad Agraria del Ecuador”. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Agraria del Ecuador. 2009.

Contento J. Incidencia de babesiosis en caninos de la ciudad de Guayaquil. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guayaquil. 2010.

Criado-Fornelio A, Rey-Valeiron C, Buling A, Barba-Carretero JC, Jefferies R, Irwin P. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. Vet Parasitol 2007;144:261–9.

Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Vet Parasitol 2008;152:173–85.

Eiras DF, Basabe J, Mesplet M, Schnittger L. First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. Vet Parasitol 2008;157:294–8.



Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013; 36(2):169-73.

Eiras DF, Craviotto MB, Baneth G, Moré G. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. *Parasitology International* 2014; 63(5): 729–734.

França RT, Da Silva AS, Loretti AP, Mazzanti CM, Lopes STA. Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day - A review. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2014; 5 (5): 466-474.

Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J* 2011;187(3):292-6.

Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1658-62.

Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 1:S4.

Jacobson LS. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. *Vet Parasitol* 2006;138(1-2):126-39.

Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ. PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet Parasitol* 2007;144: 20–27.

Little S. Enfermedades transmitidas por vectores. En: *Georgis Parasitología para veterinarios*. 9na. Edición. Barcelona, España, Ed Elsevier, 2011, p. 240-53.

McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Boudreaux C, Guedry T, Walker DH. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect Immun* 2003;71(5):2516-24.

Matjila PT, Carcy B, Leisewitz AL, Schetters T, Jongejan F, Gorenflot A, et al. Preliminary evaluation of the BrEMA1 gene as a tool for associating *Babesia rossi* genotypes and clinical manifestation of canine Babesiosis. *J Clin Microbiol* 2009;47(11):3586-92.

Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol* 2003;91(2-3):197-204.

Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of Ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 707-8.

Passos LMF, Geiger SM, Ribeiro MFB, Pfister K, Zahler-Rinder M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet Parasitol* 2005;127:81–5.

Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Dominguez Alpizar JL. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 2006;135(3 – 4): 303 – 314.

Ruiz R. Diagnóstico de Ehrlichiosis, Borreliosis y Filariosis mediante el uso del kit de canine test selection Idexx en la ciudad de Guayaquil. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guayaquil. 2002.

Santos F, Coppede JS, Pereira AL a, Oliveira LP, Roberto PG, Benedetti RBR, et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet J* 2009;179:145–8.

Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. *Babesia*: a world emerging. *Infect Genet Evol* 2012;12(8):1788-809.

Shipov A, Klement E, Reuveni-Tager L, Waner T, Harrus S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 2008;153: 131–138.

Soares JF, Carvalho L, Maya L, Dutra F, Venzal JM, Labruna MB. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Vet Parasitol* 2015; 210: 98-101.

Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol* 2011;181(1):48–60.

Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol* 2008;157(3-4):211-21.

Sykes J. Ehrlichiosis. En: Canine and feline infectious diseases. 1ra. Edición, StEd Elsevier, 2014, p. 278-87

Uilenberg G. Babesia-a historical overview. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 3-10.

Vargas-Hernández G, André MR, Faria JLM, Munhoz TD, Hernandez-Rodriguez M, Machado RZ, Tinucci-Costa M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. Vet Parasitol 2012;186(3-4):254–60.

Vezzani D, Carbajo AE, Fontanarrosa MF, Scodellaro CF, Basabe J, Cangiano G, Eiras DF. Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. Vet Parasitol 2011;176: 240-249.

Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro MH. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. J Clin Microbiol 2007;45(8):2716–9.

Ware W. Filariosis. En: Medicina interna de pequeños animales. 4ta. Edición. Barcelona, España, Ed Elsevier, 2010, p. 169-179.

Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1991;21(1):75-98.

Yamane I, Thomford JW, Gardner IA, Dubey JP, Levy M, Conrad PA. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. Am J Vet Res 1993;54(10):1579-84.

Vercammen F, De Deken R, Maes L. Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using the IFAT. Parasite 1995;2(4):407-10.

Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. Vet Parasitol 2000; 89 (3):241-8.

## ANEXOS

**CUADRO 1**

**PRINCIPALES PIROPLASMAS DESCRIPTOS EN CANINOS**

Especie	Distribución Geográfica	Tamaño (µm)	Garrapata Vector
<i>Babesia rossi</i>	Sudáfrica, Nigeria, Sudán.	2 × 5	<i>Haemophysalis elliptica</i>
<i>Babesia canis</i>	Europa	2 × 5	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Babesia vogeli</i>	África, Asia, Europa, América del norte, central y sur, Australia.	2 × 4,5	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Babesia</i> sp. coco	Este de USA	2x6	Desconocido
<i>Babesia gibsoni</i>	Sudeste de Asia, USA, Sudamérica, Australia, Europa	1 x 3	<i>H. longicornis</i> <i>H. bispinosa</i> <i>R. sanguineus</i>
<i>Babesia conradae</i>	USA (California)	0,3 x 3	<i>R. sanguineus</i>
<i>Theileria annae</i> ( <i>Babesia microti</i> – like)	Spain (Galicia,), Croatia, USA.	1 x 2,5	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>R. sanguineus</i>

Adaptado de Solano-Gallego, L y Baneth, G 2011

**CUADRO 2**

<b>DIROFILARIOSIS (CLASIFICACIÓN)</b>	<b>SÍNTOMAS</b>
<b>Clase I:</b> Asintomático	No se observan signos clínicos
<b>Clase II:</b> Leve	Tos leve
<b>Clase III:</b> Moderado, sintomático	Tos, intolerancia al ejercicio, sonidos anormales a la auscultación pulmonar
<b>Clase IV:</b> Síndrome de la vena Cava severo	Tos, intolerancia al ejercicio, disnea, sonidos pulmonares anormales, hepatomegalia, síncope, ascitis, sonidos cardiacos anormales, muerte.

Adaptado de Montoya y col, 2012

**CUADRO 3**

	16S-D:5` GGTACCYACAGAAGAAGTCC3`
<i>Primers</i>	16S-R:5` TAGCACTCATCGTTTACAGC3`
Cita	Parola y col, 2000
Producto	345 pb del gen 16S ARNr (Géneros <i>Ehrlichia</i> y <i>Anaplasma</i> )
ADN extraído	2µL
<i>Master Mix</i>	1Ude <i>Taq</i> Polimerasa; 200µM de cada dNTP; 0,5µM de cada <i>primer forward</i> y <i>reverse</i> ; 2,5 µl de PCR <i>buffer</i> 10x y 20µg/ml de BSA y 1,50 µM de MgCl <sub>2</sub>
Desnaturalización inicial	95°C por 5 min
40 ciclos	94 °C por 30s, 56 °C por 30s, 72 °C por 45s.
Extensión final	72 °C por 5 min.

#### CUADRO 4

---

<b>Nested PCR piroplasmas CICLO EXTERNO</b>	
<i>Primers Externos</i>	BTF1: 5`GGCTCATTACAACAGTTATAG3` BTR1: 5`CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC3`
Desnaturalización inicial	94°C por 4 minutos
30 ciclos	De 94°C por 30s, 60°C por 20s, 72°C por 30s.
Extensión final	72°C por 7 minutos
Producto	930pb

---

#### CUADRO 5

---

<b>Nested PCR piroplasmas CICLO INTERNO</b>	
<i>Primers Externos</i>	BTF2: 5`CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC3` BTR2: 5`GGACTACGACGGTATCTGATCG3`
Desnaturalización inicial	94°C por 4 minutos
30 ciclos	De 94°C por 30s, 62°C por 20s, 72°C por 30s.
Extensión final	72°C por 7 minutos
Producto	~800 pb

---

**CUADRO 6**

<b>Patrones de restricción de los amplificados por <i>Nested-PCR</i> de piroplasmas caninos usando las enzimas <i>BsII</i> e <i>Hinfl</i></b>			
<b>Especie de Piroplasma</b>	<b>Amplificado (pb)</b>	<b>Enzima</b>	<b>Patrón de corte (pb)</b>
<i>Theileria equi</i>	830	<i>BsII</i>	532, 297
<i>Theileria annae</i>	848	<i>BsII</i>	547, 220, 79
<i>Babesia conradae</i>	842	<i>BsII</i>	Sin cortar (842)
<i>Babesia vogeli</i>	791	<i>Hinfl</i>	592, 102, 80, 18*
<i>Babesia canis</i>	792	<i>Hinfl</i>	593, 102, 80, 18*
<i>Babesia</i> sp.	781	<i>Hinfl</i>	584, 102, 78, 18*
<i>Babesia rossi</i>	793	<i>Hinfl</i>	303, 289, 102, 81, 18
<i>Babesia gibsoni</i>	791	<i>Hinfl</i>	321, 270, 102, 81, 18

Ref: \* indica las especies que requieren mayor procesamiento para su identificación (ver CUADRO 7)

**CUADRO 7**

<b>Doble digestión con las enzimas <i>HincII</i> y <i>BsII</i> para las especies <i>Babesia canis</i>, <i>B. vogeli</i> y <i>Babesia</i> sp.</b>	
<b>Especie</b>	<b>Patrón de restricción (pb)</b>
<i>Babesia canis</i>	327, 278, 188
<i>Babesia vogeli</i>	514, 278
<i>Babesia</i> sp.	416, 276, 98

**CUADRO 8**

---

<i>Primers</i>	DIDR-F1 AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG DIDR-R1 AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA
Desnaturalización inicial	94°C por 4 minutos
30 ciclos	De 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 45s.
Extensión final	72°C por 7 minutos

---

**CUADRO 9**

---

<b>Patógeno</b>	<b>pb</b>
<i>Dirofilaria immitis</i>	542
<i>Dirofilaria repens</i>	484
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	578
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	584

---



TABLA 1

<b>PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR VECTORES GUAYAQUIL – ECUADOR (n=500)</b>	
Piroplasmas intraeritrocitarios - merozoitos (>2,5 µm)	25 (5,0%)
Estructuras morulares en leucocitos mononucleares	11 (2,2%)
Test de Woo - Microfilarias	4 (0,8%)
Total de infectados	40 (8,0%)
<b>Nested PCR-RFLP - Piroplasmas (n=25)</b>	
<i>Babesia vogeli</i>	25 (100%)
<b>PCR -Estructuras morulares (n=11)</b>	
<i>Ehrlichia canis</i>	11 (100%)
<b>Microfilarias (n=4)</b>	
Detección de antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i>	3 (75,0%)
PCR - <i>Dirofilaria immitis</i>	3 (75,0%)
PCR - <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	1 (25,0%)

**TABLA 2**

**ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS EN CANINOS INFECTADOS POR PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR VECTORES**

	<i>Babesia vogeli</i> n=25 caninos	<i>Ehrlichia canis</i> n=11 caninos	<i>Microfilarias</i> n=4 caninos
<b>ALTERACIONES CUANTITATIVAS</b>			
Anemia leve (Hematocrito >25% y <37%)	7 (28,0%)	4(36,4%)	1 (25,0%)
Anemia moderada (Hematocrito >15% y <25%)	0 (00,0%)	3 (27,2%)	0 (0,00%)
Anemia marcada (Hematocrito <15%)	5 (20,0%)	1 (9,10%)	0 (0,00%)
Anemia no regenerativa (Índice Reticulocitario <2)	12 (48,0%)	7 (63,6%)	1 (25,0%)
Anemia regenerativa (Índice Reticulocitario ≥ 2)	0 (00,0%)	1(9,10%)	0 (0,00%)
Leucocitosis (>18x 10 <sup>9</sup> Leucocitos/L)	1 (4,00%)	1(9,10%)	0 (0,00%)
Leucopenia(<6 x 10 <sup>9</sup> Leucocitos/L)	9 (36,0%)	4(36,4%)	0 (0,00%)
Trombocitopenia Leve (>80 y <150 x 10 <sup>9</sup> plaquetas/L)	1 (4,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Trombocitopenia moderada (>40 y <80 x 10 <sup>9</sup> plaquetas/L)	9 (36,0%)	4(36,4%)	1 (25,0%)
Trombocitopenia marcada (<40 x 10 <sup>9</sup> plaquetas/L)	14 (56,0%)	7 (63,6%)	0 (0,00%)
<b>ALTERACIONES CUALITATIVAS</b>			
Policromasia	16 (64,0%)	2 (18,2%)	0 (0,00%)
Monocitos reactivos	5 (20,0%)	8 (72,7%)	0 (0,00%)
Macroplaquetas	9 (36,0%)	5 (45,5%)	1 (25,0%)