

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TECNICA DE INMUNOENZAYO
LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS, EN CLINICAS DE LA CIUDAD DE
DELICIAS, CHIHUAHUA; MEXICO.**

TESIS

POR:

TOMAS ANGEL CENICEROS DÍAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila

Noviembre 2008

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna

División de Ciencia Animal

DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TECNICA DE INMUNOENZAYO
LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS, EN CLINICAS DE LA CIUDAD DE
DELICIAS, CHIHUAHUA; MEXICO.

Tesis

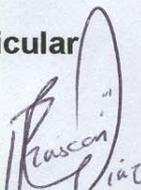
TOMAS ANGEL CENICEROS DÍAZ

Tesis elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial para obtener el grado de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

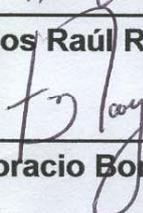
Comité Particular

Presidente:



M.V.Z Carlos Raúl Rascón Díaz

Vocal:



I.Z. Jorge Horacio Borunda Ramos

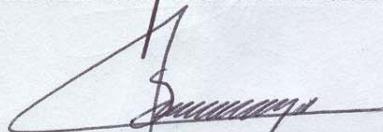
Vocal:



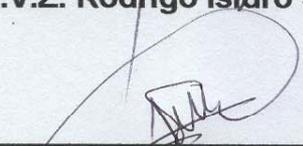
M.V.Z. Cuauhtémoc Félix Zorrilla

Vocal

suplente:



M.V.Z. Rodrigo Isidro Simón Alonso



M.C. José Luis Francisco Sandoval Elías
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

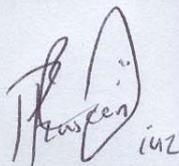
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TECNICA DE INMUNOENZAYO
LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS, EN CLINICAS DE LA CIUDAD DE
DELICIAS, CHIHUAHUA; MEXICO.**

TESIS

APROBADO POR EL COMITÉ DE TESIS

PRESIDENTE DEL JURADO



Handwritten signature of Carlos Raúl Rascón Díaz, with the name 'Rascón Díaz' written below it.

MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Handwritten signature of José Luis Fco. Sandoval Elías, with the name 'Sandoval Elías' written below it.

M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS

DEDICATORIA.

A DIOS.

Por haberme permitido llegar hasta el punto en donde estoy ahora, y darme fuerza para finalizar esta etapa muy importante de my vida que hoy he logrado con gran satisfacción.

A MIS PADRES Y HERMANOS.

A ellos con gran cariño y enorme agradecimiento porque con sacrificio, esfuerzo, amor y comprensión me han apoyado durante toda my vida a ellos por darme el ejemplo la enseñanza de responsabilidad y gracias a su confianza necesaria la cual agradezco ya que me han dado un legado muy importante, para ellos my eterno agradecimiento, por lo cual he logrado formar my carrera profesional que es para my la mejor herencia.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a dios y a toda mi familia que me brindaron su apoyo, a los amigos por su amistad incondicional.

AI M.V.Z. CARLOS RAUL RASCON DIAZ por ser mi amigo, por ser mi asesor principal y por su ayuda para la conclusión de este trabajo.

A MIS PADRES.

TOMAS CENICEROS VILLA

Y

MARIA DEL ROSARIO DIAZ GOMEZ

GRCIAS POR EL APOYO BRINDADO DURANTE TODA MI VIDA Y DURANTE TODA MI CARRERA.

Índice

Contenido	Página
INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE CUADROS.....	II
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA.....	4
IV. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUNICIPIO DE DELICIAS CHIHUAHUA, MEXICO	4
4.1 Clima.....	5
4.2 Geografía.....	5
V. ANTECEDENTES.....	5
VI. HISTORIA.....	10
VII. ETIOLOGÍA.....	10
VIII. SINONIMIAS.....	10
IX. EPIDEMIOLOGÍA.....	11
9.1 Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	11
X. PATOGENIA.....	13
XI. SIGNOS.....	14
11.1 Signos multisistemicos.....	14
11.2 Signos oculares.....	15
11.3 Signos neurológicos.....	15
11.4 Poliartritis.....	15

XII.	DIAGNÓSTICO.....	16
	12.1 Hematología.....	16
	12.2 Bioquímica.....	16
	12.3 Frotis.....	17
	12.4 Serología.....	17
	12.5 Inmunoblot y Reacción de Cadena de Polimerasa.....	18
	12.6 Inmunoensayo Ligado a enzimas (ELISA).....	18
XIII.	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	19
XIV.	HISTOPATOLOGÍA.....	19
XV.	TRATAMIENTO.....	21
XVI.	PREVENCIÓN.....	22
XVII.	IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA.....	24
XVIII.	JUSTIFICACIÓN.....	24
XIX.	OBJETIVOS.....	25
	19.1 Objetivo General.....	25
	19.2 Objetivo Especifico.....	25
XX.	META.....	25
XXI.	HIPOTESIS.....	25
XXII.	MATERIALES Y METODOS.....	25
XXIII.	RESULTADOS	31
XXIV.	DISCUSIÓN.....	37

XXV. CONCLUSIÓN	38
LITERATURA CITADA.....	39

INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Localización del municipio de Delicias, Chihuahua; México.....	4
Figura 2. Ciclo vital de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	13
Figura 3. Morula de <i>Ehrlichia canis</i>	17
Figura 4. Gotas de conjugado en tubo de muestra.....	26
Figura 5. Deposito de sangre y plasma en tubo de muestra.....	26
Figura 6. Mezcla invertida de muestra.....	27
Figura 7. Aplicación de la muestra en el dispositivo Snap.....	27
Figura 8. Activación del dispositivo Snap.....	28
Figura 9. Dispositivo Snap presionado para su activación.....	28
Figura 10. Tiempo de espera para la obtención de resultados	29
Figura 11. Interpretación de resultados.....	29
Figura 12. Control positivo y punto de activación de <i>E. canis</i>	30

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Seropositivos a <i>Ehrlichia canis</i> en perros de Yamaguchi, por sexo, edad y raza.....	8
Cuadro 2. Terapeutica antimicrobiana para ehrlichiosis canina.....	22
Cuadro 3. Compuestos más empleados en el control de las garrapatas del perro.....	23
Cuadro 4. Productos más modernos de larga acción (Duración de 28-30 días) empleados en el control de garrapatas en perros.....	24
Cuadro 5. Caninos positivos anticuerpos de <i>Ehrlichia canis</i>	31
Cuadro 6. Casos positivos a anticuerpos de <i>Ehrlichia canis</i>	32
Cuadro 7. Historia de los perros utilizados en el experimento.....	33

I. RESUMEN

En el presente se trabajaron 30 muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA) provenientes de 30 caninos diferentes de la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México, sospechosos a la enfermedad de ehrlichiosis monocítica canina, para posteriormente practicar el análisis y confirmar la presencia de anticuerpos de *Ehrlichia canis* por el método de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

De las 30 muestras analizadas, 21 fueron positivas, (70%) y 9 negativas, (30%). Se analizaron las variables como el sexo, la edad y la raza, además de la signología clínica. Los resultados fueron similares al estudio realizado por Romano en 1998, en Baja California; México, en el cual se obtuvo un 93.3% de seroprevalencia de la enfermedad.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), anticoagulante, enfermedades parasitarias.

II. INTRODUCCIÓN

La primera *Ehrlichia* que se descubrió fue *Ehrlichia canis* en un perro pastor alemán en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935, y fue hasta finales de los años 60 que la ehrlichiosis canina monocítica se consideraba como un proceso relativamente benigno. Ahora esta enfermedad está reconocida en todo el mundo, como una enfermedad infecciosa causando una extensiva morbilidad y mortalidad entre perros domésticos y otros caninos, y se le conoce también con los nombres de Pancitopenia tropical canina y Fiebre de garrapata. Los huéspedes vertebrados de *Ehrlichia canis* se han limitado a miembros de la familia canina, además del perro doméstico, se consideran huéspedes reservorios el coyote, el zorro y el chacal. El vector artrópodo de *Ehrlichia canis* es la garrapata del perro *Rhipicephalus sanguineus*. La garrapata adquiere *Ehrlichia canis* al alimentarse, como larvas o ninfas, en perros rickettsiémicos y transmiten la infección como ninfas o adultas. También puede ser transmitida *Ehrlichia canis* por transfusiones de sangre contaminada. El curso subsecuente de la ehrlichiosis se ha dividido en tres fases: aguda, subclínica y crónica, basándose en los signos clínicos y las anormalidades clinicopatológicas. La fase aguda se inicia después de un periodo de incubación de 8 a 20 días, y dura de dos a cuatro semanas. La fase subclínica con un periodo de incubación de 20 a 40 días, se establece cuando el animal sobrevive a la fase aguda y se caracteriza por la persistencia de microorganismos y el alza en los títulos de anticuerpos. En los perros con infección natural, la fase subclínica tiene una duración de 6 a 9 semanas pudiendo persistir hasta años. La fase crónica puede ser leve y manifestarse por una enfermedad vaga y pérdida de peso con alteraciones hematológicas menos graves. La infección por *Ehrlichia canis* puede causar una amplia gama de signos clínicos. Un cuadro común es la depresión, letargo, fiebre, pérdida de peso leve y anorexia con tendencias hemorrágicas o sin ellas, puede mostrar cambios en color o el aspecto de los ojos y presentar ceguera. Los datos más comunes son uveítis anterior y afección de las retinas. Se han observado convulsiones, estupor, ataxia, anisocoria. El diagnóstico se realiza a través del examen clínico. La falta de signos hemorrágicos no descarta la presencia de la enfermedad, por lo que se deben hacer basándose en una combinación de signos clínicos, anormalidades, exámenes hematológicos y exámenes serológicos para obtener un diagnóstico etiológico definitivo. Se utilizan los siguientes métodos: el PCR, fluorescencia indirecta de anticuerpos, frotis y la técnica de inmunoensayo ligado a

enzimas (ELISA). Existen muchas otras patologías que cursan con trombocitopenia o con sintomatología hemorrágica en la práctica clínica, como por ejemplo, la intoxicación por estrógenos o con warfarina entre las más comunes, pero también cabe señalar otras enfermedades infecciosas como fiebre manchada de las montañas rocosas, babesiosis, moquillo canino, hepatitis infecciosa viral canina, leptospirosis, entre otras. El tratamiento de la ehrlichiosis canina incluye medicamentos antirickettsiales y cuidado de apoyo. La tetraciclina y la oxitetraciclina se consideraron los medicamentos iniciales de elección y aún actúan bien, pero hoy en día se utilizan con mayor frecuencia la doxiciclina y minociclina. En la actualidad no se dispone de una vacuna; por consiguiente, los principales medios de prevención son quimioterapias y medidas para controlar garrapatas. La ehrlichiosis canina es una enfermedad con un alto potencial zoonótico, por lo que adquiere una real importancia en términos de salud pública, por efecto de la alta prevalencia e infestación de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en nuestros perros y el eventual traspaso de este parásito al ser humano cuando el contacto es muy estrecho y existe un gran hacinamiento, se ha relacionado en un 99 % a la ehrlichiosis monocítica humana con la *Ehrlichia canis*.

III. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA

En la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México, al igual que en todo el estado y en los estados que conforman el norte de Mexico, existe un alto grado de incidencia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Esta garrapata es portadora de varios patógenos que causan enfermedades infecciosas zoonóticas, entre ellas encontramos la ehrlichiosis canina que es producida por la rickettsia *Ehrlichia canis*. Con respecto a lo anterior, sospechamos de una incidencia considerable de *Ehrlichia canis* en la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México

IV. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUNICIPIO DE DELICIAS, CHIHUAHUA; MÉXICO

El municipio de Delicias es uno de los 67 Municipios del Estado de Chihuahua. (Fig. 1.).



Figura 1. Localización del municipio de Delicias, Chihuahua; México (Wiki pedía, la enciclopedia libre.htm)

- Altitud: 1.170 msnm
- Huso horario: Tiempo de la montaña, UTC-7

4.1. Clima

Es semiárido, temperatura media anual de 18,6 °C. La precipitación pluvial media anual es de 294,7 milímetros, con un promedio anual de 82 días de lluvia y una humedad relativa del 45%. Se estiman 60 días de lluvia y 2 de granizo. Los días con heladas son 110 y existen 3 días de heladas tempranas en octubre y 4 de heladas tardías en abril, según las estadísticas oficiales. Los vientos dominantes proceden del sudoeste.

4.2. Geografía

Dominan por su porción noreste y suroeste los suelos solonchaks de textura media en pendientes de nivel sin asociaciones o inclusiones y en su fase salina. En la porción restante predominan los yermosoles hálpicos de textura media, en pendientes de nivel o quebradas. El uso del suelo es fundamentalmente agrícola e industrial. El tipo de tenencia de la tierra corresponde en su mayoría al régimen de pequeña propiedad (18.936 hectáreas) y en segundo término el ejidal con 7.856 hectáreas distribuidas en seis ejidos.

V. ANTECEDENTES

En el norte de Australia se realizó una encuesta serológica con el objetivo de detectar *Ehrlichia canis* en perros urbanos de los mayores centros populares del norte de Australia. El procedimiento fue el siguiente, se tomaron muestras de 316 perros domésticos, colectados en el norte de Australia en centros populares de Townsville, Cairns, Darwin, Kununurra y Borroome, de Mayo de 1997 hasta Agosto de 1999, investigándose la evidencia de infecciones por *Ehrlichia canis*, usando diagnóstico por la técnica de fluorescencia indirecta de anticuerpos. Los resultados fueron, de los 316

exámenes, 7 reaccionaron a la fluorescencia indirecta de anticuerpos para *Ehrlichia canis*, ninguno de los perros con ese resultado mostraba signos clínicos de ehrlichiosis canina aguda o crónica, un perro fue sacrificado, los otros seis se evaluaron por medio de la técnica de PCR, dando negativo a *Ehrlichia canis*. La conclusión es que el norte de Australia probablemente este libre de *Ehrlichia canis* (Masson y col., 2001).

En Japón se estudiaron los anticuerpos contra la proteína 24Kda del *Rhipicephalus sanguineus* (Rs24p), fueron detectados por ELISA para evaluar la relación entre anticuerpos e infestación de garrapatas. Los títulos significativos de 3 perros que experimentaron 2 infestaciones con garrapatas adultas fueron incrementando transitoriamente después de la segunda infestación. Existía una diferencia significativa en los títulos entre perros positivos del control infectados naturalmente con garrapatas. Estos resultados sugirieron que los anticuerpos de (Rs24p) detectados por ELISA sean un marcador de la exposición de la garrapata. No existía diferencia significativa entre títulos de perros expuestos a la garrapata y a los perros seropositivos con anticuerpos de *Ehrlichia canis*. Algunos perros positivos con anticuerpos de *Ehrlichia canis* demostraron, sin embargo, títulos más altos que los perros con garrapatas. La conclusión fue que la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se puede relacionar con *Ehrlichia canis* en Japón (Inokuma y col., 2000).

En baja California; México, se realizó un trabajo que corresponde a un ensayo clínico, de tipo observacional, transversal y prospectivo que se realizó durante los meses comprendidos de Septiembre a Diciembre de 1997. Se evaluaron 30 perros, se recolectaron 5 ml. de sangre en tubos sin anticoagulante, se realizó la prueba de detección mediante el uso de tira reactiva Canine Multi-Test Dip-Sticks (método de ELISA). Los resultados de los 30 perros muestreados, el 93.3 % (28) reaccionaron positivamente a *E. canis*, de estos pacientes positivos el 76.6 % (23), tuvieron títulos 1:40 y 1:10,000. El 16.6 % (5) fueron positivos a *Rickettsia rickettsii* y el 6.6 % (2) a *Borrelia burgdorferi* (Lyme). Solamente en un paciente se pudo observar la mórula del microorganismo intracitoplasmáticamente en un monocito por medio del frotis sanguíneo. Se puede mencionar como datos adicionales que la ehrlichiosis canina monocítica es una enfermedad infectocontagiosa y la signología más frecuente que presentan los pacientes

afectados fue epistaxis, pérdida de peso, palidez de mucosas, anorexia y depresión (Romano y col., 1998).

En la universidad de Yamaguchi Japón se realizó una encuesta serológica sobre *Ehrlichia canis* ya que *Rhipicephalus sanguineus* es el mayor parásito externo en el trópico de Okinawua y está relacionado con varios patógenos (Cuadro 1). Este trabajo trata de evaluar a los perros con *Rhipicephalus sanguineus* de Yamaguchi y otros vecindarios para la seroprevalencia de *Ehrlichia canis*. Se tomarán los siguientes factores, sexo, edad, raza y localización. Para el análisis serológico fueron seleccionadas 430 pruebas para una colección de suero, de perros en el hospital animal de la Universidad de Yamaguchi. Perros de Yamaguchi y otros vecindarios (Saga, Oita, Hiroshima, Shimane, kagawa, Ehime) se han estado examinando en el hospital desde Abril de 1994 hasta Julio de 1998. La historia y la observación física indicaban infestación por garrapatas (Inokuma y col., 1999).

Factor		N°	N° casos positivos (%)
	Total	430	20 (4.7)
Sexo	Macho	232	10 (4.3)
	Hembra	198	10 (5.1)
Edad	0-2	74	3 (4.1)
	2-4	85	6 (7.1)
	4-6	60	4 (6.7)
	6-8	61	3 (4.9)
	8-10	43	1 (2.3)
	10-12	38	2 (5.3)
	12-14	28	0 (0.0)
	14-16	13	0 (0.0)
	Desconocidos	28	1 (3.6)

Raza	Pastor de Shetland	32	0 (0.0)
	Cobrador dorado	28	4 (14.3)
	Beagle	26	4 (15.4)
	Shit-zu	22	0 (0.0)
	Husky	18	1 (5.6)
	Maltes	17	0 (0.0)
	Labrador	12	0 (0.0)
	Pug	10	0 (0.0)
	Yorkshire	10	0 (0.0)
	Pomeranian	7	0 (0.0)
	Dachshund	7	0 (0.0)
	Pointer	6	1 (16.7)
	Akita	31	0 (0.0)
	Shiba-inu	29	1 (3.4)
	Kishu	5	0 (0.0)
	Mongrel	109	7 (6.4)
	Otros	61	2 (3.3)

Cuadro 1. Seropositivos a *Ehrlichia canis* en perros de Yamaguchi, por sexo, edad y raza (Inokuma y col., 1999)

En Suiza fueron examinadas 996 muestras de suero de perros, con el objetivo de determinar anticuerpos de *Ehrlichia canis* y el agente causante de la ehrlichiosis canina granulocítica.

- 75 perros sospechosos a *Ehrlichia spp.*

- 122 perros sospechosos a borreliosis.
- 157 perros sospechosos a enfermedades sistemáticas no asociadas con las garrapatas.

El resto de las muestras fueron obtenidas de perros sanos que residen en el norte (235 muestras) y del sur (407 muestras). Las muestras fueron probadas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos de dos agentes, los de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia phagocytophila*, que es un marcador sustituto del agente de la ehrlichiosis granulocítica. 22 de 996 (2.2%) muestras de suero tenían anticuerpos de *Ehrlichia canis*, 75 de 996 positivos a *Ehrlichia phagocytophila*; los perros seropositivos tenían historia de recorridos fuera de Suiza. La conclusión fue que la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se encuentra en el sur de Europa (Italia, España, Portugal y Francia). Ocasionalmente fue introducida por perros, albergándose en jaulas para perros y en otros lugares cálidos (Pusterla y col., 1998).

VI. HISTORIA

La primera *Ehrlichia* que se descubrió fue *Ehrlichia canis* en un perro pastor alemán en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935 (Mandaluniz y col., 1997; Harrus y col., 1999).

Hasta finales de los años 60, la ehrlichiosis canina se consideraba como un proceso relativamente benigno. Fue la epizootia que se desencadenó en los perros de la armada americana en Vietnam, la que hizo cambiar la consideración que hasta el momento se tenía sobre la enfermedad, ya que alrededor de 300 perros desarrollaron una enfermedad hemorrágica fatal, llamada pancitopenia tropical canina, caracterizada por debilidad, epistaxis, anemia y leucopenia (Mandaluniz y col., 1997).

Ahora esta enfermedad está reconocida en todo el mundo, como una enfermedad infecciosa causando una extensiva morbilidad y mortalidad entre perros domésticos y otros caninos, principalmente en áreas tropicales y subtropicales. En Estados Unidos de Norte América la ehrlichiosis canina es principalmente encontrada en los estados del sureste (Wen y col., 1997; Harrus y col., 1999).

VII. ETIOLOGÍA

La ehrlichiosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas, causada por la rickettsia *Ehrlichia canis*, que se localiza dentro del citoplasma y que se reproduce por fisión binaria (Neer, 2000).

VIII. SINONIMIAS

Pancitopenia tropical canina, Fiebre de garrapatas (Bowman, 1995).

IX. EPIDEMIOLOGÍA

Los huéspedes vertebrados de *Ehrlichia canis* se han limitado a miembros de la familia canis; dentro de los cuales podemos observar, el perro doméstico, el coyote, el zorro y el chacal. El vector artrópodo de *Ehrlichia canis* es la garrapata del perro *Rhipicephalus sanguineus*. La garrapata adquiere *Ehrlichia canis* al alimentarse (como larvas o ninfas) en perros rickettsiémicos (y transmiten la infección como ninfas o adultas). Las garrapatas adultas sobreviven hasta 568 días y transmiten la infección a perros susceptibles cuando menos durante 155 días después de infectarse. De acuerdo a lo anterior permite que el vector y el patógeno pasen el invierno e infesten perros susceptibles la primavera siguiente (Castella, 1999; Neer, 2000).

Recientemente se ha visto que solo experimentalmente con *Dermacentor variabilis* se puede transmitir *Ehrlichia canis*. También puede ser transmitida *Ehrlichia canis* por transfusiones de sangre contaminada (Harrus y col., 1999).

Rhipicephalus sanguineus (garrapata de las perreras o garrapata parda del perro), es una de las garrapatas más ampliamente distribuida. Su actividad en zonas templadas es estacional desde la primavera hasta el otoño. En invierno es menor la prevalencia de esta especie, pero en zonas tropicales y subtropicales, puede hallarse durante todo el año. Esta garrapata es incapaz de vivir en climas fríos, pero puede sobrevivir gracias al cobijo del hombre proporcionado a sus perros, hospedadores principales de esta especie (Castella, 1999; Neer, 2000).

9.1. Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*

Consiste de tres hospedadores como se muestra en la figura 2. La hembra repleta realiza una puesta aproximada de 2,000-4,000 huevos, tras un período de preoviposición variable de 3-83 días, en lugares protegidos de la luz (Bowman, 1995; Castella, 1999).

Las larvas eclosionan entre los 8-67 días (período de incubación) y después de un período de maduración, están capacitadas para fijarse a un primer hospedador; esta fase presenta un período de supervivencia que, en condiciones favorables, pueden sobrepasar los 253 días. Entre los 3 y 7 días pos-fijación la larva se suelta una vez repleta o alimentada y busca un lugar resguardado donde realiza su primera muda (Bowman, 1995; Castella, 1999).

Las ninfas aparecen entre los 6 y los 23 días después de la caída de la larva repleta y, casi de forma inmediata, están preparadas para subir a un segundo hospedador con el fin de volver a alimentarse. El tiempo que necesita para alcanzar la repleción varía entre 4-9 días. Pasando los días, la ninfa repleta se suelta de su hospedador, cae al suelo y busca un sitio resguardado para realizar la segunda muda a partir de la cual emergerán los adultos entre los 12-129 días después de la caída de la ninfa repleta; puede sobrevivir más de 568 días en espera de un hospedador. Tanto los machos como las hembras se fijarán en un tercer hospedador para realizar la ingestión de sangre (Bowman, 1995; Castella, 1999).

Las hembras solo se fijan y succionan sangre una vez, mientras que los machos se alimentan de forma intermitente y persisten más tiempo sobre el hospedador para que la mayoría de las hembras queden fecundadas. Estas, una vez alimentadas (6-50 días), caen al suelo y buscan refugio donde realizar la puesta (Bowman, 1995; Castella, 1999).

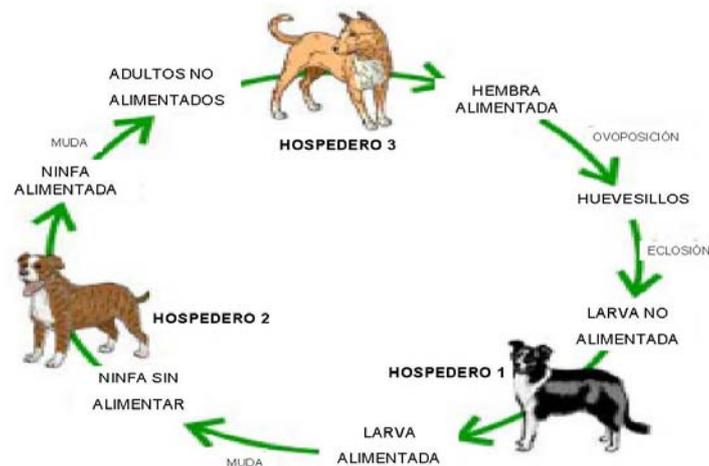


Figura 2. Ciclo vital de *Rhipicephalus sanguineus* (Lord, 2001).

X. PATOGENIA

La infección del huésped vertebrado ocurre cuando una garrapata infectada ingiere sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio en donde se alimenta. El microorganismo también se transmite por transfusiones sanguíneas de donadores infectados. El curso subsecuente de la ehrlichiosis se ha dividido en tres fases: aguda, subclínica y crónica, basándose en los signos clínicos y las anomalías clinicopatológicas (Neer, 2000).

La fase aguda se inicia después de un periodo de incubación de 8 a 20 días, y dura de dos a cuatro semanas, durante las cuales se multiplican los microorganismos en las células mononucleares por fisión binaria y se diseminan a la totalidad del cuerpo. Luego colonizan los órganos del sistema fagocítico mononuclear (SFM), como bazo, hígado, médula ósea y nódulos linfáticos, donde provocan una hiperplasia y en los endotelios vasculares una consecuente vasculitis e inflamación de estos órganos (Neer, 2000; Sainz y col., 2001).

En las alteraciones hematológicas se presenta una trombocitopenia por disminución en el tiempo de vida de las plaquetas, por efecto del mayor consumo, secuestro y destrucción de estas, debido a la vasculitis que afecta a las pequeñas arterias y la inflamación o por la respuesta del sistema inmunológico y/o de coagulación. Este es un efecto directo causado por la infección (Neer, 2000; Sainz y col., 2001).

La fase subclínica con un periodo de incubación de 20 a 40 días, se establece cuando el animal sobrevive a la fase aguda y se caracteriza por la persistencia del microorganismo y el alza en los títulos de anticuerpos. En los perros con infección natural, la fase subclínica tiene una duración de 6 a 9 semanas pudiendo persistir hasta años. Si los animales infectados son competentes eliminarán *Ehrlichia canis*. De no ser así, se presenta la fase crónica de la infección (Neer, 2000; Sainz y col., 2001).

La fase crónica puede ser leve y manifestarse por una enfermedad vaga y pérdida de peso con alteraciones hematológicas menos graves. La forma crónica grave se caracteriza por deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos que dan por resultado pancitopenia. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del microorganismo, cuando hay una enfermedad concomitante en algunas razas y en animales más jóvenes (Neer, 2000).

XI. SIGNOS

La infección por *Ehrlichia canis* puede causar una amplia gama de signos clínicos que varían entre distintas localidades geográficas, esto depende tanto de la dosis infectante, raza del perro infectado, estado inmunológico al momento de la infección, como de otras enfermedades concomitantes (Neer, 2000).

11.1. Signos multisistémicos

Un cuadro común es la depresión, letargo, fiebre, poca pérdida de peso y anorexia con tendencias hemorrágicas o sin ellas. Cuando se presentan hemorragias suelen manifestarse en forma de petequias, equimosis, o ambas. Dichas hemorragias se presentan en la dermis a cualquier superficie de mucosa, siendo más frecuente la epistaxis. El examen físico de estos pacientes también suele relevar linfadenomegalia y esplenomegalia en 20 y 25 % respectivamente. Los signos respiratorios y cardiacos relacionados entre sí, pueden ocurrir debido a hemorragias y como consecuencias de la anemia, que puede llegar a ser grave (Harrus y col., 1998; Russell, 1999; Tiller, 2000; Neer, 2000; Ford 2002).

11.2. Signos oculares

Los perros pueden mostrar cambios en color o el aspecto de los ojos y presentar ceguera. Los datos más comunes son uveítis anterior y afección de las retinas, como coriorretinitis, papiledema, hemorragia de la retina, infiltrados perivasculares en la retina y desprendimiento retiniano (Slatter, 1990; Standes y col., 1998; Harrus y col., 1998; Max y col., 1999; Neer, 2000).

11.3. Signos neurológicos

Los signos neurológicos de ehrlichiosis se deben principalmente a meningitis por inflamación, hemorragia, o a ambas. Ocurre disfunción neurológica con daño del tejido nervioso central o periférico adyacente. Las infecciones con *Ehrlichia canis* y cepas granulocíticas han sido más comunes. Los signos no se distinguen de los de la fiebre manchada de las montañas rocosas. Se han observado convulsiones, estupor, ataxia, disfunción vestibular aguda central o periférica, anisocoria, disfunción cerebrosa, temblor de intención e hiperestesia generalizada o localizada (Neer, 2000; Ford, 2002).

11.4. Poliartritis

En ocasiones, los perros con ehrlichiosis pueden presentar cojera con marcha rígida secundaria o poliartropatía. La enfermedad articular puede ocurrir por hemartrosis, depósitos de complejos inmunitarios y derrames neutrofílicos en la articulación (Neer, 2000).

XII. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se realiza a través del examen clínico. La falta de signos hemorrágicos no descarta la presencia de la enfermedad, por tal motivo el examen clínico debe ser acompañado de exámenes hematológicos y exámenes serológicos para obtener un diagnóstico etiológico definitivo (Neer, 2000).

12.1. Hematología

Las alteraciones hematológicas se comprueban mejor en infecciones por *Ehrlichia canis* e incluyen anemia (82 %) que suele ser no regenerativa, trombocitopenia (82%) y leucopenia (32%). La pancitopenia suele resultar en la fase crónica (Neer, 2000; Ford, 2002).

Se encuentra trombocitopenia en todas las etapas de la ehrlichiosis canina, nunca hay que descartar ehrlichiosis canina solo porque la cuenta de plaquetas es normal. Es necesario llevar serología si hay signos clínicos compatibles (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).

12.2. Bioquímica

Las anormalidades químicas séricas más frecuentes han incluido hiperproteinemia en un 33%, hiperglobulinemia (39%), hipoalbuminemia (43%). Resultados de valores elevados de globulina (Harrus y col., Neer, 2000).

Otros datos incluyen proteinuria, hematuria y tiempo de sangrado prolongado (incluso en ciertos perros con cifras de plaquetas normales). Se observa una pérdida máxima de proteínas, especialmente de albúmina, de dos y media a tres y media semanas después de la inoculación que se resuelve alrededor de seis semanas después de la infección (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).

12.3. Frotis

Es posible establecer un diagnóstico definitivo a *Ehrlichia canis* cuando se demuestran mórulas en monocitos o leucocitos de frotis sanguíneos o aspirados de tejidos como bazo, pulmón, y ganglios linfáticos (Figura.3). Es difícil y requiere tiempo encontrar mórulas. Es posible observar mórulas en el interior de neutrófilos que se encuentran en el frotis de sangre periférica (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).



Figura 3. Mórula de *Ehrlichia canis* (Waner and Harrus, 2000)

12.4. Serología

El diagnóstico de *Ehrlichia canis* suele basarse en los resultados positivos de la prueba de fluorescencia indirecta de anticuerpos. Este estudio detecta anticuerpos séricos tempranos como a los siete días del comienzo de la infección, aunque en algunos perros no se tomen seropositivos hasta 28 días después del comienzo de la infección. En los perros no tratados, las concentraciones séricas de anticuerpos llegan al máximo a los 80 días de la post-infección. Durante los siete primeros días posteriores a la inoculación,

el título consiste en IgA e IgM y alrededor de los 20 días la mayor parte es IgG, después de 20 días suele considerarse como prueba de infección, exposición, o ambas, pero es posible que este dato varíe con los métodos de cada laboratorio. Por el contrario, debido a que después del tratamiento o la posible recuperación persiste un título el cual puede ser medible, un título positivo no necesariamente significa que la enfermedad o los síntomas clínicos del paciente se deban estrictamente a la enfermedad de la ehrlichiosis canina, en especial en áreas endémicas en las que existen animales con títulos a *Ehrlichia canis* sin signos clínicos (Wen y col., 1997; Neer, 2000; Alleman, 2001; Mc Bride y col., 2001).

12.5. Inmunoblot y Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Con fines de investigación y con la posibilidad de ser útiles clínicamente en el futuro, se han utilizado el método de Western inmunoblot y la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para caracterizar y diferenciar los distintos microorganismos que causan la enfermedad de ehrlichiosis canina. Las inmunoblot para *Ehrlichia canis* muestran varios antígenos de reacción y los más prominentes son los que se separan en una banda ancha a 27kd. El Western inmunoblot detectará anticuerpos a *Ehrlichia canis* tempranamente de dos a ocho días después de la exposición a la enfermedad y las pruebas de PCR tienen resultados positivos de 4 a 10 días posterior a la infección. También ha sido útil Western inmunoblot para diferenciar entre infecciones con *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii*. Esta característica es benéfica porque la mayor parte de los perros con la infección de *Ehrlichia ewingii* tendrán títulos positivos de fluorescencia indirecta de anticuerpos a *Ehrlichia canis* y no se dispone de una prueba de fluorescencia indirecta de anticuerpos para *Ehrlichia ewingii*, se ha demostrado que la PCR es un método sensible para detectar infección aguda por *Ehrlichia canis* en perros (Ohashi, 1998; Harrus y col., 1998; Neer, 2000; Yu y col., 2000; Unver y col., 2001)

12.6. Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA)

La técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) es un procedimiento cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (enzyme linked inmuno sorbent assay). Como todo ensayo inmunoenzimático, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima, para relevar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos. De un modo general se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac)), a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcadas con una enzima (peroxidasa de rábano picante); agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante y se cuantifica (Alleman y col., 2001).

XIII. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Existen muchas otras patologías que cursan con trombocitopenia o con sintomatología hemorrágica en la práctica clínica, como por ejemplo, la intoxicación por estrógenos o con warfarina entre las más comunes, pero también cabe señalar otras enfermedades infecciosas como Fiebre manchada de las montañas rocosas, Babesiosis, Moquillo canino, Hepatitis infecciosa viral canina y Leptospirosis junto a las enfermedades inmunológicas como las coagulopatías inmunomediadas y el lupus eritematoso sistémico (Tiller y col., 2000).

XIV. HISTOPATOLOGÍA

Los hallazgos histopatológicos a simple vista en perros infectados con *Ehrlichia canis*, incluyen hemorragias petequiales y equimóticas en las superficies serosas y

mucosas de la mayor parte de los órganos, incluso de la cavidad nasal, pulmones, riñones, vejiga urinaria, tubo gastrointestinal y tejido subcutáneo. Durante la fase aguda se encuentra con mayor frecuencia la linfadenomegalia, esplenomegalia y hepatomegalia generalizadas. Es posible que estén crecidos todos los nódulos linfáticos y tengan un color pardusco. Un dato adicional en caso crónico es emaciación con pérdida del estado corporal total. La médula ósea es hipercelular y de color rojo en la fase aguda pero en la enfermedad crónica se torna hipoplásica y pálida por coloración adiposa (Harrus y col., 1998; Neer, 2000).

Uno de los datos histopatológicos más característicos es un infiltrado perivascular de células plasmáticas en muchos órganos, como pulmones, cerebro, meninges, riñones, nódulos linfáticos, médula ósea, bazo y en ocasiones en la piel y en las mucosas. Al parecer, el grado de infiltrado de células plasmáticas aumenta en perros con afección crónica (Harrus y col., 1998; Neer, 2000).

En el sistema nervioso central (SNC) hay meningoencefalitis no supurativa multifocal que incluye al tallo encefálico, cerebro medio y la corteza cerebral. Casi todas las lesiones se localizan ventralmente en el tallo encefálico y alrededor de la sustancia gris y blanca periventriculares, solo ocurre una encefalitis muy leve del cerebro. En casi todos los perros se encuentra a la necropsia lesiones meníngeas microscópicas y no obstante muestran signos clínicos de meningitis (Harrus y col., 1998; Neer, 2000).

Las alteraciones pulmonares en la ehrlichiosis canina son comunes con neumonía intersticial. Al inicio, hay una acumulación subendotelial de células mononucleares y es posible observar hemorragias intersticiales y alveolares. Puede también encontrarse microorganismos de *Ehrlichia canis* en macrófagos del endotelio vascular pulmonar (Neer, 2000).

En las lesiones renales se incluye una vasculitis con infiltrado de las células plasmáticas localizados en la unión corticomedular, en los perros con ehrlichiosis

ocurre glomerulonefritis y plasmocitosis intersticial, esto explicaría la proteinuria observada en algunos casos. Después de la infección con *Ehrlichia canis*, las alteraciones histológicas en los riñones son mínimas, pero el examen estructural muestra fusión de procesos podálicos que coinciden con el desarrollo de proteinuria (Harrus y col., 1998; Neer, 2000).

XV. TRATAMIENTO

El tratamiento de la enfermedad ehrlichiosis canina incluye los medicamentos antirickettsiales y los cuidados de apoyo. En general, cuando más temprano se inicia el tratamiento del proceso patológico, más favorables serán los resultados y pronósticos (Neer, 2000).

Las tetraciclinas y oxitetraciclinas se consideraron los medicamentos de elección, pero hoy en día se utilizan con mayor frecuencia la doxiciclina y minociclina, estos dos últimos fármacos son tetraciclinas liposolubles, semisintéticas, que se absorben con gran facilidad y proporcionan concentraciones sanguíneas, tisulares e intracelulares altas, se pueden administrar por un tiempo más corto que la tetraciclina y ser más eficientes (Harrus y col., 1998; Breitschwerdt y col., 1998; Neer, 2000; Plumb, 1999; Max. y col., 1999).

En los perros con enfermedad en la fase aguda y crónica leve suele ocurrir una mejoría clínica en el transcurso de 24-48 hrs. después de iniciada la terapéutica con las tetraciclinas. La cifra de plaquetas comienza a aumentar en forma correspondiente durante este tiempo y por lo general llega a los límites normales alrededor de 14 días después de la terapéutica. La recuperación no equivale a inmunidad permanente y es posible que los perros se infecten nuevamente con *Ehrlichia canis* después de un tratamiento eficaz (Cuadro 2; Neer, 2000).

También se ha utilizado con éxito el Dipropionato de imidocarb para el tratamiento de infecciones por *Ehrlichia canis* y se dispone para uso en Estados Unidos. Los efectos secundarios pasajeros del Dipropionato de imidocarb dependientes de las dosis incluyen ptialismo, exudados nasal seroso, diarrea y disnea (Neer, 2000).

Otro medicamento que se ha valorado es la Enrofloxacin para el tratamiento de la infección por *Ehrlichia canis* a dosis de 10mg/kg dos veces al día PO durante 21 días (Neer, 2000).

FARMACO	DOSIS (MG/KG)	VIA PREFERIDA	INTERVALOS (HRS)	DURACION (DIAS)
Tetraciclina	22	PO	8	14-21
Oxitetraciclina	20-40	PO	8	7-28
Doxiciclina	5-10	PO	12-24	14-21
Minociclina	12.5-25	PO	12	7
Dipropionato de Imidocarb	5-7	IM	Una vez	Repetir en dos semanas

Cuadro 2. Terapéutica antimicrobiana para ehrlichiosis canina (Ford, 2002; Neer, 2000; Plumb, 1999; Max y col., 1999)

IM: Intramuscular

Además de la terapéutica antimicrobiana, suele justificarse el tratamiento con líquidos para deshidratación o transfusiones sanguíneas si el perro tiene anemia grave (Neer, 2000).

XVI. PREVENCIÓN

En la actualidad no se dispone de una vacuna; por consiguiente, los principales medios de prevención son quimioterapias y medidas para controlar garrapatas. Se ha demostrado que la tetraciclina es un medicamento profiláctico eficaz contra la infección inicial o la reinfección cuando se administra por vía oral a una dosis de 6.6mg/kg/día. Es posible lograr el control en áreas endémicas conservando programas de control de garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*) en perros (Cuadro 3 y 4) e instalaciones. Se debe detectar los perros infectados por medio de diagnósticos (ELISA), siguiendo esta guía, debe romperse el ciclo de infección por *Ehrlichia canis* en la garrapata, debido a que no ocurre transmisión transovárica de *Ehrlichia canis* en la garrapata *Rhipicephalus* de un huésped residente (Neer, 2000).

El control de la garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*) presenta unas características propias que derivan de su peculiar biología. Se trata de una garrapata muy bien adaptada al perro y al ambiente doméstico en el que este vive. Fuera de su hospedador, su ciclo biológico se desarrolla en el interior de perreras y viviendas humanas. Por ello, la planificación de las medidas de control deben tener en cuenta tanto al hospedador como al ambiente (Castella, 1999).

En ambientes infestados puede emplearse las fumigaciones con carbaril, permetrinas, piretrinas, entre otros. En las perreras es importante que los tratamientos vayan acompañados por un adecuado mantenimiento de las instalaciones, con el propósito de evitar que las garrapatas tengan acceso a lugares escondidos donde realicen las mudas y estén al abrigo de los garrapaticidas (Castella, 1999).

COMPUESTO	SUSTANCIA	PRESENTACION
Formanidina	Amitraz al 12.5%	Concentrado emulsionable

Organoclorados	Lindano	Concentrado emulsionable
Organofosforados	Coumaphos 1% Coumaphos 20% Coumaphos 50%	Jabón de Barra Polvo Concentrado emulsionable
Piretrinas	Permetrina	Concentrado emulsionable

Cuadro 3. Compuestos más empleados en el control de las garrapatas del perro (Castella, 1999)

SUSTANCIAS	PRESENTACIÓN
Fipronil + methoprene	Ampolleta tópica y spray
Selamectin	Ampolleta tópica

Cuadro 4. Productos más modernos de larga acción (Duración de 28-30 días) empleados en el control de garrapatas en perros (Ballweber 2002)

XVII. IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA

La ehrlichiosis canina es una enfermedad con un alto grado de zoonosis, por lo que adquiere una gran importancia en términos de la salud pública, por efecto de la alta prevalencia de infestación de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en nuestros perros y

el eventual traspaso de este parásito al ser humano cuando el contacto es muy estrecho y existe un gran hacinamiento, se a relacionado en un 99.9% a la ehrlichiosis monocítica humana con la *Ehrlichia canis* (Unver y col., 2001).

XVIII. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de la presente investigación sobre el diagnóstico de anticuerpos de *Ehrlichia canis* por el método de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), se fundamenta en que el diagnóstico es rápido y preciso, y nos ayuda a descartar o demostrar la presencia de anticuerpos de *Ehrlichia canis*, y en caso de que el resultado sea positivo podemos administrar un tratamiento temprano que nos lleva a un pronóstico favorable para los caninos enfermos.

A lo que concierne con la salud pública, a través de este método, demostrando la infección con *Ehrlichia canis*, podemos aumentar las medidas de prevención y el control evitando así las infecciones zoonóticas.

XIX. OBJETIVOS

19.1. Objetivo General

Detectar la evidencia de anticuerpos de la rickettsia *Ehrlichia canis* en caninos de la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México.

19.2. Objetivo Específico

Diagnosticar por el método de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), anticuerpos de *Ehrlichia canis*, causante de la enfermedad infecciosa ehrlichiosis canina, con muestra provenientes de caninos sospechosos a la enfermedad.

XX. META

Diagnosticar por el método de ELISA a 30 caninos sospechosos de la enfermedad *Ehrlichiosis canina* en la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México.

XXI. HIPÓTESIS

Tomar 30 muestras sanguíneas de los caninos sospechosos a la enfermedad *Ehrlichiosis canina*, con antecedentes o la presencia de la garrapata (*Rhipicephalus sanguíneos*), Y que el 50% de estos casos son positivos a los anticuerpos de *Ehrlichia canis*.

XXII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajo con 30 muestras de sangre completa provenientes de 30 caninos diferentes, sospechosos a la enfermedad de *Ehrlichiosis canina*. El procedimiento fue de la siguiente manera:

1. Sujetando el envase en forma vertical, se añadió 4 gotas de conjugado al tubo para muestra (tapa azul) como se muestra en la figura 4.



Figura 4. Gotas de conjugado en tubo de muestra

2. Se utilizó la pipeta provista en el cual se depositó 3 gotas de la muestra (sangre completa, suero o plasma) dentro del tubo para muestras (tapa azul).



Figura 5. Deposito de sangre y plasma en tubo de muestra.

3. Se tapo el tubo de muestra y se mezcló completamente invirtiendo el tubo de 3-5 veces (Figura 6).



Figura 6. Mezcla invertida de muestra

4. Se colocó el dispositivo en una superficie plana agregando el contenido en su totalidad, se hizo de manera cautelosa para no derramar el contenido fuera del mismo, La muestra corrió a través de la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30-60 segundos, parte de la muestra permaneció en el dispositivo, hasta obtener un color azul en el círculo de activación (Figura 7).



Figura 7. Aplicación de la muestra en el dispositivo Snap.

5.- Cuando el color apareció en el círculo de activación, se presiono con firmeza el activador para que la muestra se recorriera por el cuerpo del dispositivo (Figura 8 y 9).



Figura 8. Activación del dispositivo snap.



Figura 9. Dispositivo Snap presionado para su activación.

Nota: se observó que algunas muestras no fluían hacia el círculo de activación dentro de los 60 segundos y además, el círculo puede no colorearse; cuando esto pasó, se presionó el activador después de que la muestra haya fluido a través de la ventana de resultados, se mantuvo el dispositivo en posición horizontal para asegurar resultados precisos.

6. La interpretación de los resultados se obtuvo 8 minutos después (Figura 10).



Figura 10. Tiempo de espera para obtener resultados

Nota: el control positivo puede desarrollarse más rápido, pero el resultado no estará completo sino hasta los 8 minutos.

7. Para la interpretación de resultados en la prueba se determino y se observó los puntos de activación en la ventana del mismo, el desarrollo de color en los puntos de activación es proporcional a la concentración de anticuerpos de *E. canis* y *B. burdorgferi* y de antígeno de gusano del corazón, si el control positivo no desarrolla color se debe repetir la prueba (Figura 11).

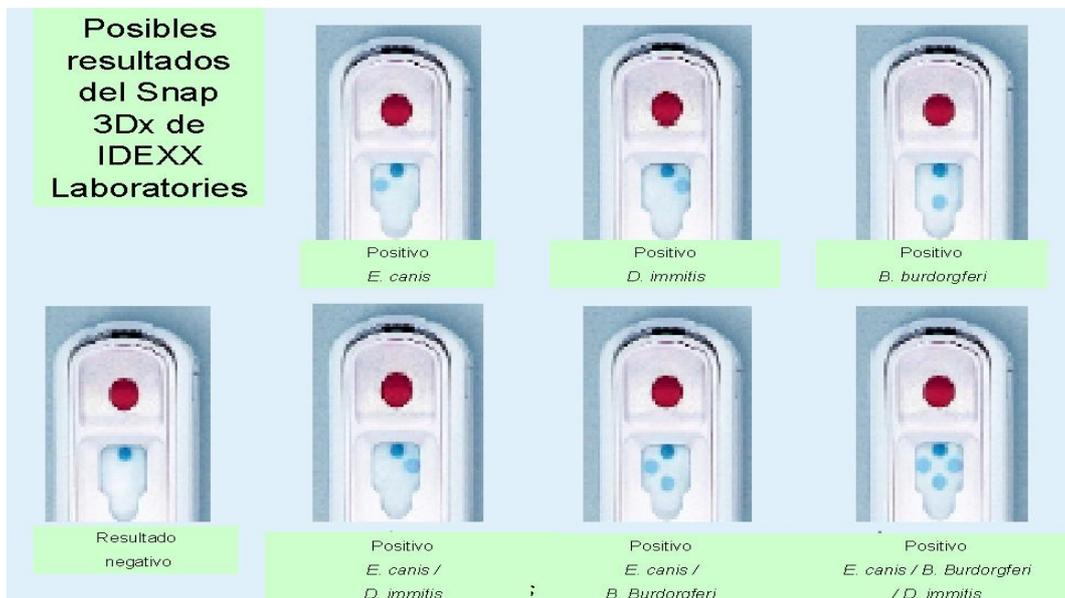


Figura 11. Interpretación de resultados

- Resultado negativo: Solo el punto de activación positivo se colorea como se observa en la figura 11.
- Resultado positivo.: Anticuerpos *E. canis*: el control positivo y el punto de activación *E. canis* desarrolla coloración (Figura 12).



Figura 12. Control positivo y punto de activación de *E. canis*.

8. Resultados inválidos.

1. Fondo: si la muestra fluye hasta el círculo de activación, puede haber coloración en el fondo, algo de coloración en el fondo es normal, sin embargo, si la coloración de la prueba obscurece el resultado es necesario repetir la prueba.

2. Ausencia en el desarrollo de color: si el control positivo no desarrolla color, repetir la prueba.

XXIII. RESULTADOS

De las 30 muestras de sangre entera proveniente de distintos caninos de la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México y que eran sospechosos a la enfermedad de ehrlichiosis canina causada por *Ehrlichia canis*, 21 muestras (70%) en total resultaron positivas a antígenos de *Ehrlichia canis*, y 9 negativas (30%), las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 23 muestras fueron provenientes de machos, resultando positivas 19 de ellas equivalente a un 82%. Mientras que solo 2 de las siete muestras provenientes de hembras resultaron positivas, lo cual es un 28 % de la muestra. El Cuadro 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Edad (años)	M	H	TOTAL	N° DE CASOS POSITIVOS (%)		TOTAL POSITIVOS
				M	H	
2-3	10	2	12	9 (90)	1 (50)	10
3-5	9	3	12	8 (88)	0	8
6-8	4	1	5	2 (50)	1 (100)	3
8-9	0	1	1	0	0	0
TOTAL	23	7	30	19	2	21

Cuadro 5. Caninos positivos anticuerpos de *Ehrlichia canis*

RAZA	SEXO	Nº	EDAD EN AÑOS	Presencia de garrapatas al momento de la prueba	Nº de casos positivos (%)
Antiguo Pastor Ingles	M	1	2 a 3	SI	1 (100)
	H	0	0	-	-
Boxer	M	3	2 a 3	SI	2 (66)
	H	1	8 a 9	SI	-
Chihuahueño	M	2	3 a 5	SI	2 (100)
	H	0	0	-	-
Cocker	M	3	6 a 8	SI	1 (33)
	H	1	2 a 3	SI	-
Criollo	M	3	2 a 3	SI	3 (100)
	H	2	3 a 5	SI	-
Dachshund	M	1	3 a 5	SI	1 (100)
	H	0	0	-	-
Dálmata	M	2	3 a 5	SI	2 (100)
	H	1	2 a 3	SI	1(100)
Doberman	M	2	2 a 3	SI	2 (100)
	H	0	0	-	-
Pit Bull	M	1	3 a 5	SI	1 (100)
	H	0	0	-	-
Poodle	M	1	6 a 8	SI	1 (100)
	H	1	3 a 5	SI	-
Pug	M	1	2 a 3	SI	1 (100)
	H	0	0	-	-

Rottweiler	M	3	3 a 5	SI	2 (66)
	H	1	6 a 8	SI	1 (100)

Cuadro 6. Casos positivos a anticuerpos de *Ehrlichia canis*

M: Macho

H: Hembra

De acuerdo con la hipótesis planteada, queda demostrado que de las muestras colectadas, el 70% son positivas, lo cual sobrepasa el 50% planteado en la hipótesis. En el cuadro 7 muestra parte de la historia clínica de los perros utilizados en el experimento.

Cuadro 7. Historia clínica de los perros utilizados en el experimento.

#	RAZA	SNAP	NOMBRE	SEXO	EDAD	PESO EN KG	OBSERVACIONES
1	ANTIGUO PASTOR INGLES	a) [+] b) [-] c) [-]	GUFFY	MACHO	2 años 3 meses	32	Epistaxis – anorexia – temperatura 38.6 °C – * debilidad
2	BOXER	a) [+] b) [-] c) [-]	MALACARA	MACHO	2 años 6 meses	28	Hematomas en todo el cuerpo – temperatura 38.8 °C – *
3	BOXER	a) [+] b) [-] c) [-]	CHIQUILIN	MACHO	2 años 9 meses	26	petequias abdominales – hematuria – anorexia – temperatura 39.4 °C – *
4	BOXER	a) [-] b) [-] c) [-]	RAY	MACHO	2 años 1 mes	24	Parálisis tren posterior – eccema cutáneo general – anorexia – temperatura 38.6 °C – **
5	BOXER	a) [-] b) [-] c) [-]	MUÑECA	HEMBRA	8 años 3 meses	26	Hematomas abdominales – lanorexia – temperatura 38.7 °C – *
6	CHIHUAHUEÑO	a) [+] b) [-] c) [-]	TENZO	MACHO	4 años 6 meses	2.6	Convulsiones – debilidad tren posterior – temperatura 38.5 °C – *
7	CHIHUAHUEÑO	a) [+] b) [-] c) [-]	BLUE	MACHO	3 años 9 meses	2.3	Debilidad – anemia – temperatura 38.6 °C – ***

8	COCKER	a) [+] b) [-] c) [-]	MILO	MACHO	6 años 7 meses	19	Anemia – debilidad – anorexia – dificultad para caminar- – temperatura 38.8 °C – *
9	COCKER	a) [-] b) [-] c) [-]	GUAPO	MACHO	7 años 2 meses	23	Hematomas abdominales – conjuntivitis – epistaxis – temperatura 38.7 °C – *
10	COCKER	a) [-] b) [-] c) [-]	KUPER	MACHO	6 años 10 meses	21	Parálisis tren posterior – anorexia – conjuntivitis – temperatura 39.4 °C – ***
11	COCKER	a) [-] b) [+] c) [-]	KOKIS	HEMBRA	2 años 4 meses	18	Anorexia – petequias abdominales – temperatura 38.6 °C – *
12	CRIOLLO	a) [+] b) [-] c) [-]	BAMBINO	MACHO	2 años 9 meses	16	Parálisis –petequias abdominales – anorexia – temperatura 39.3 °C – **
13	CRIOLLO	a) [+] b) [-] c) [-]	PELOS	MACHO	2 años 7 meses	18	Melena – petequias – anorexia – laringitis – temperatura 38.8 °C – ***
14	CRIOLLO	a) [+] b) [-] c) [-]	ROKO	MACHO	2 años 1 mes	20	Hematomas abdominales – anorexia – conjuntivitis –

							temperatura 39.4 °C – *
15	CRIOLLO	a) [-] b) [-] c) [-]	CHICANA	HEMBRA	3 años 6 meses	13	Conjuntivitis Epistaxis – depresión – anorexia – temperatura 39.4 °C – **
16	CRIOLLO	a) [-] b) [-] c) [-]	LEYDY	HEMBRA	4 años 8 meses	9	Ascitis – – depresión – debilidad tren posterior – dificultad para orinar – temperatura 39.3 °C – *
17	DACHSHUND	a) [+] b) [-] c) [-]	JUNIOR	MACHO	4 años 5 meses	9	Epistaxis – pérdida de apetito – conjuntivitis – temperatura 38.6 °C – **
18	DALMATA	a) [+] b) [-] c) [-]	REX	MACHO	3 años 2 meses	25	Parálisis tren posterior – debilidad – depresión – anemia – secuelas de parálisis C.I. – temperatura 39.2 °C – *
19	DALMATA	a) [+] b) [-] c) [-]	KINBA	MACHO	4 años 5 meses	27	Conjuntivitis– anemia – depresión – temperatura 38.7 °C – *
20	DALMATA	a) [+] b) [-] c) [-]	KONY	HEMBRA	2 años 9 meses	23	Convulsiones – pérdida de peso – debilidad temperatura 38.6 °C – *

21	DOBERMAN	a) [+] b) [-] c) [-]	GUFFY	MACHO	2 años 7 meses	34	Anorexia – petequias abdominales – depresión – temperatura 38.6 °C – ***
22	DOBERMAN	a) [+] b) [-] c) [-]	FIURER	MACHO	2 años 6 meses	33	Melena – depresión – con mucho apetito – temperatura 38.8 °C – *
23	PITBULL	a) [+] b) [-] c) [-]	ROCKY	MACHO	4 años	26	Melena – parálisis tren posterior – anorexia – anemia – temperatura 38.7 °C – *
24	POODLE	a) [+] b) [-] c) [-]	KINBA	MACHO	7 años 1 mes	12	Epistaxis – petequias y hematomas abdominales – conjuntivitis – temperatura 38.6 °
25	POODLE	a) [-] b) [-] c) [-]	NENA	HEMBRA	4 años 2 meses	10	Parálisis tren posterior – anorexia – depresión – laringitis – temperatura 39.4 °C – *
26	PUG	a) [+] b) [-] c) [-]	CHATO	MACHO	2 años 5 meses	9	Anemia – anorexia – dermatitis – temperatura 38.7 °C – ***
27	ROTTWEILER	a) [+] b) [-] c) [-]	KILLER	MACHO	3 años 2 meses	42	Epistaxis – anemia – hematomas y petequias abdominales –

							temperatura 38.6 °C – *
28	ROTTWEILER	a) [+] b) [-] c) [-]	RAMBO	MACHO	3 años 10 meses	43	Convulsiones – depresión – debilidad – temperatura 38.6 °C – ***
29	ROTTWEILER	a) [-] b) [-] c) [-]	MAX	MACHO	4 años 9 meses	44	Dificultad para caminar – anemia – taquicardia – disnea – temperatura 38.8 °C
30	ROTTWEILER	a) [+] b) [-] c) [-]	BLACKY	HEMBRA	7 años 3 meses	41	Parálisis tren posterior convulsiones – melena – temperatura 38.7 °C – *

- Presencia de garrapatas: * Leve **Moderado ***Abundante
- a) *Ehrlichia canis* b) *Dirofilaria immitis* c) Lyme
- **[+]** Positivo **[-]** Negativo

Nota: Todos presentaron inflamación de ganglios submaxilares.

IV. DISCUSIÓN

De acuerdo a Sainz y col. (2000), el cuadro clínico que mayormente se encuentra es fiebre, La cual puede ser considerada como inespecífica, por otro lado la pérdida de peso, apatía y anorexia, son signos frecuentes dentro de la enfermedad, un 40% de los casos presenta linfadenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia, además de un típico cuadro hemorrágico, presentándose el 35% como petequias y equimosis en la piel y las mucosas, melena, hemorragias retinianas o conjuntivales (Romano, 1998).

En Baja California, la seroprevalencia de la enfermedad es de 93.3% (Romano, 1998). Habrá que considerar que es un estado cercano a los Estados Unidos de Norte América y que la enfermedad es más común en ese país.

Estos hallazgos son importantes de considerar, ya que en el norte de Australia se concluye que probablemente esté libre de *Ehrlichia canis*, debido a que el vector *Rhipicephalus sanguineus* es difícil de encontrar (Masson, 2001), más sin embargo, en nuestro medio es común el vector que es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

El trabajo realizado en Delicias, Chihuahua; México, arroja datos similares al encontrado por Romano en 1998 en Baja California; México, siendo de un 70%; que es un indicador considerable dentro de la región donde se realizó el estudio.

XXV. Conclusión.

Este trabajo de investigación demuestra que la enfermedad de *Ehrlichia canis* está presente en la Cd. de Delicias, Chihuahua, y no depende de una raza en específico sino que afecta a cualquier raza, a demás se encuentra una diferencia significativa en estos resultados, ya que de 21 muestras positivas de las 30 analizadas, 19 de ellas fueron en machos, de un total de 23, lo cual es elevado ya que hembras fueron 7 casos de los cuales solo 2 presentaron respuesta antígeno anticuerpo a la prueba. Con lo que se determina que en machos tenemos un porcentaje equivalente a un 82 % de casos positivos, mientras que las hembras fue tan solo el 28 %.

Por otra parte este trabajo fue realizado solo en una clínica veterinaria y con pacientes que acuden a consulta con una sintomatología similar a la presente en la enfermedad, por ello no es factor predisponente determinante que los machos tengan una mayor susceptibilidad.

También podemos concluir que la garrapata *Rhipicephalus sanguíneos* está altamente distribuida en la Ciudad de Delicias, Chihuahua; México y es un factor importante en la vigilancia de la salud pública.

En mi experiencia propia este trabajo me dice que es necesario llevar un control de los casos clínicos que se presenten, para tener una referencia comparativa de las diferentes clínicas, además una excelente prevención en el control de la garrapata *Rhipicephalus sanguíneos*.

LITERATURA CITADA

1. Alleman A, McSherry L, Barbet A, Breitschwerdt E, Sorenson H, Bowie M, and Belanger M. 2001. Recombinant Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis*: a Potential Diagnostic Tool. J Clin Microbiol. 39(7):2494-2499.
2. Ballweber L, 2002. Flea control offers better protection for pets; humans form diseases. Dvm in Focus a supplement to dvm newmagazine. p. 21-23.
3. Bowman D, 1995. Parasitology for veterinarians. 6th ed. Saunders Company USA. p. 55-58.
4. Breitschwerdt E, Hegarty B, and Hancock S, 1998. Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two *Ehrlichia canis* Strains. Antimicrob Agents Chemother. 42(2):362-368.
5. Castella J, 1999. Parasitosis cutánea, en Parasitología veterinaria. Cordero del Campillo. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana de España. Cap.38. p. 711-719.
6. Etting S, and Feldman E, 2000. Diseases of the dog and cat. Textbook of Veterinary internal medicine. 5th ed. Edit. Saunders USA. p. 402- 405.
7. Ford R, 2002. Tracking the development of Tick-borne diseases. New Surveillance, diagnostic techniques provide practitioners with better detection methods for Lyme disease and ehrlichiosis. Dvm in Focus a supplement to dvm newmagazine. p. 9-13.
8. Glynn K, Krammer V, and Vugia D, 1996. Human ehrlichiosis: new emerging tick-borne diseases in California Morbidity. Division of Communicable Disease Control. <http://msmosquito.com/ehrlich.html>

9. Harrus S, Ofri R, Waner T, Aizenberg I, 1998. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol.* 78:155-160.
10. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, and Bark H, 1998. Therapeutic Effect of Doxycycline in Experimental Subclinical Canine Monocytic Ehrlichiosis: Evaluation of a 6-Week Course. *J Clin Microbiol.* 36(7):2140-2142.
11. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley J, Poland A, and Bark H, 1998. Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol.* 36(1):73-76.
12. Harrus S, Waner T, Avi K, Aizenberg I, Voet H, and Bark H, 1998. Investigation of splenic function in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol. Immunopathol.* 62:15-27.
13. Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, and Cornelissen A, 1999. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 37(9):2745-2749.
14. Harrus S, Waner T, Yaakov A, Eitan B, Huo-cheng P, and Bark H, 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 66:241-249.
15. Inokuma H, Ohna K, and Onishi T, 2000. Is the detection of anti-*Rhipicephalus sanguineus* (Rs24p) antibodies a valuable epidemiological tool of tick infestation in dogs. *Vet Res.* 31:365-369.
16. Inokuma H, Ohna K, and Yamamoto S, 1999. Serosurvey of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci.* 61(10):1153-1155.

17. Kordick S, Breitschwerdt E, Hegarty B, Southwick K, Colitz C, Hancock S, Bradley J, Rumbough R, McPherson J, and McCormack J, 1999. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol.* 37(8):2631-2638.
18. Mandaluniz N, García A, Barral M, y Juste R, 1997. Desarrollo de un protocolo de PCR para la detección de *Ehrlichia Phagocytophila*. Primer estudio de prevalencia en el vector, en informe técnico no. 71. Dpto. de Industria, Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. <http://personal.redestb.es/rajuste/epha01.htm>
19. Masson R, Lee J, Curran J, Moss A, Van D, 2001. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs forms the major population centers of northern Australia. *Aust Vet J.* 79(8):559-562.
20. Max J, Breitschwerdt B, Chomel B, Eschner A, and Neer T, 1999. Routable on ticks and Tick transmitted diseases. *Vet Forum.* 16(4):38-45.
21. Mc Brid J, Corstvet R, Breitschwerdt E, and Walker D, 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with Recombinant Proteins. *J Clin Microbiol.* 39(1):315-322.
22. Neer T, 2000. Ehrlichiosis monocítica y granulocítica canina en enfermedades infecciosas en perros y gatos. Green C, and Harvey J, 2ª Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana México. Cap. 28. p.153-162.
23. Ohashi N, Unver A, Zhi N, and Rikihisa Y, 1998. Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia canis* and Application of the Recombinant Protein for Serodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 36(9):2671-2680.
24. Plum D, 1999. Drug hand book. 3rd ed. Edit. Saunders Company USA. p. 229-231.

25. Pusterla N, Pusterla J, Deplazes P, Wolfensberger C, Muller W, Horauf A, Reusch C, and Lutz H, 1998. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. J Clin Microbiol. 36(12):3460-3465.
26. Romano O, Tinoco G, Covarrubias P, 1998. Demostración de *Ehrlichia canis* mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, Baja California. AMMVEPE. 9(3):86.
27. Russel T, 1997. *Ehrlichiosis canina*: implicaciones clínicas de factores humorales, en Terapéutica veterinaria de pequeños animales. Kirk R, y Bonagura J. 12^a ed. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana México. p. 317-320.
28. Sainz A, Rodríguez F, 2000. La ehrlichiosis en los perros: presente y futuro. Colegio oficial de veterinarios de Madrid España... http://www.colvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm
29. Slatter in collaboration with Dr. Chambers E, 1990. Fundamentals of veterinary ophthalmology. 2nd ed. Edit. Saunders Company USA. p. 514-517.
30. Standes F, Nuuman H, and Wyman M, 1998. Oftalmología para el veterinario practico. Edit. Intermédica Buenos Aires Argentina. p.147.
31. Tiller L, and Smith K, 2000. The 5- Minutes consult canine and feline. 2nd ed. Edit. Lippincot Williams and Wilkins. Baltimore USA. p. 644-645.
32. Unver A, Ohashi N, Tajima T, Stich R, Grover D, and Rikihisa Y, 2001. Transcriptional Analysis of p30 Major Outer Membrane Multigene Family of *Ehrlichia canis* in Dogs, Ticks, and Cell Culture at Different Temperatures. J Infect Immun 69(10):6172-6178.

33. Unver A, Pérez M, Orellana N, Huang H, and Rikihisa Y, 2001. Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. J Clin Microbiol. 39(8):2788-2793.

34. Waner T, and Harrus S, 2000. Recent advances in canine Infectious diseases, Canine Monocytic Ehrlichiosis. International Veterinary information.
http://www.ivis.org/advances/infect_Dis_Carmichael/waner/chapter_frm.asp

35. Wen B, Rikihisa Y, Mott J, Greene R, Kim H, Zhi N, Couto G, Unver A, and Bartsch R, 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with Doxycycline. J Clin Microbiol. 35(7):1852-1855.

36. Yu X, McBride J, Diaz M, and Walker D, 2000. Molecular Cloning and Characterization of the 120-Kilodalton Protein Gene of *Ehrlichia canis* and Application of the Recombinant 120-kilodalton Protein for Serodiagnosis of Canine Ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 38(1):369-374.