

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA DE INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE MATAMOROS, COAH.”

POR

SONIA GUADALUPE CHIHUAHUA CASTAÑÓN

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREON, COAHUILA

OCTUBRE DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA DE INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE MATAMOROS, COAH.”

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SONIA GUADALUPE CHIHUAHUA CASTAÑON

ASESOR:

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA DE INMUNOESNAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE MATAMOROS, COAH.”

TESIS

APROBADO POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO

Una firma manuscrita en tinta que parece decir "Rascón Díaz".

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Una firma manuscrita en tinta que parece decir "Rodrigo Simon Alonso".

MVZ. RODRIGO SIMON ALONSO



Coordinación 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 TÉCNICA DE INMUNOESNAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE MATAMOROS, COAH.”

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

PRESIDENTE

MC. JORGE ITURBIDE RAMIREZ

VOCAL

MVZ. CUAUHTÉMOC FÉLIX ZORRILLA

VOCAL

IZ. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS

VOCAL SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por concederme concluir este sueño, esta vida y esta carrera.

A Alfonso (Poncho) por ser un gran hombre, ese padre, ese amigo y el amor de mi vida, gracias.

A mis padres: Ma. Cruz Castañón Lozano y J. Natividad Chihuahua Sifuentes (Paisa).

A mis hermanos: Rosaura (Chawa), Manuel, Hugo, Paty, Cecy, Amparo, Andrea y Maritza.

A la Dra. Chihuahua (Membo) Gracias una y mil veces.

A mi casa, mi escuela, mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, porque aun sin conocerte ya te amaba.

A mis amigos, compañeros de Generación 2009, por las experiencias y aventuras Gracias, por los grandes y buenos momentos nunca se olvidan.

Al MVZ. Carlos Raúl Rascón Díaz gracias por tu tiempo y por darme esta gran oportunidad.

Al MC. Jorge Iturbide Ramírez, MVZ. Cuauhtémoc Félix Zorrilla, IZ. Jorge Horacio Borunda Ramos.

A Luis (El Secretario) gracias por tu tiempo, dedicación y apoyo.

Al Rancho Productor de Leche Villa Ahumada, Sr. Mario Fuentes, a todos los miembros, empleados y compañeros de esta gran empresa, por estos ya casi 10 años de conocerlos, por todo el apoyo, el trabajo, los jugos y almuerzos compartidos.

A todas aquellas personas que estuvieron a mi lado, Mauro Chihuahua muchas gracias tío ahora es también un ejemplo de fortaleza y lucha, Natividad Alvarado por ser casi mi hermano y un “papi” para Valeria, José Luis Saucedo gracias por darme ese hombro y ese abrazo cuando mas lo necesite, Juan Manuel Barco gracias por tu paciencia, tu apoyo incondicional y tu amistad, Luz y Dalia por aquellas sonrisas y esos momentos en los que fuimos cómplices, Eduardo espero algún día podamos ser socios y fundadores de nuestra Explotación Hormiguicola, Rosa (fresa) porque desde el día que te conocí admire tu fuerza y ese gran espíritu.

A mi otra familia: Esmeralda, Magüe, Chuy, Cesar, Lupillo, Blanca, Yolanda, a mi suegra Margarita Villa mil gracias. En fin a todos, tíos (as), abuelos (f), primos, cuñados (as), parientes y amigos.

Siempre soñé este momento y pensé en que escribiría, hoy por fin lo logre, espero no haber olvidado a nadie y si lo hice en un papel los recordare en mi mente y en mi corazón.

Gracias.

DEDICATORIA:

A mi hija Ana Valeria Gurrola Chihuahua.

A Juan Alfonso Gurrola Villa por ser mi otra mitad, te amo.

A la MVZ. Carmen Chihuahua Sifuentes por ser mi punto a seguir, por ser una gran mujer y mi gran amiga, tqm.

A la familia: Chihuahua Castañón.

Familia: Alvarado Chihuahua por abrirme las puertas de su casa y ser otra familia para mi hija.

Familia: Morales Villa por el apoyo recibido.

A mis sobrinos: Chihuahua, Morales, Gurrola, Santos y a los que pronto llegaran Andresito, Erick y la Negrita.

A mi mamá Andrea Lozano Reyes por que hay alguien que me cuida en lo más alto del cielo.

A mis compañeros, amigos y Profesores del Jardín de niños "Francisco Gonzales Bocanegra", Escuela Primaria "Lic. Adolfo López Mateos", Esc. Sec. Gral. No. 1 "Mariano Matamoros" y Centro de Bachillerato Tecnológico agropecuario No. 1 "Dr. Mario Castro Gil".

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	2
III. INTRODUCCION AL PROBLEMA.....	4
IV. ANTECEDENTES.....	4
V. HISTORIA.....	8
VI. ETIOLOGÍA.....	8
VII. SINONIMIAS.....	8
VIII. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
8.1 Ciclo Biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9
IX. PATOGENIA.....	10
X. SINOLOGIA.....	12
10.1 Signos Multisistémicos.....	12
10.2 Signos Oculares.....	12
10.3 Signos Neurológicos.....	12
10.4 Poliartritis.....	13
XI. DIAGNÓSTICO.....	13
11.1. Hematología.....	13
11.2. Bioquímica.....	14
11.3. Frotis.....	14
11.4. Serología.....	15
11.5. Inmunoblot y Reacción en Cadena de Polimerasa.....	15
11.6. Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA).....	16
XII. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	16
XIII. HISTOPATOLOGÍA.....	16
XIV. TRATAMIENTO.....	17
XV. PREVENCIÓN.....	19

XVI. IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA	21
XVII. JUSTIFICACIÓN	21
XVIII. OBJETIVOS	22
18.1. Objetivo General.....	22
18.2. Objetivo Específico.....	22
XIX. META.....	22
XX. HIPÓTESIS	22
XXI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
XXII. RESULTADOS	25
XXIII. DISCUSIÓN	27
XXIV. LITERATURA CITADA	28

RESUMEN

En el presente trabajaron 30 muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA) provenientes de 30 caninos diferentes de la ciudad de Matamoros Coah., 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).

Los resultados fueron considerables ya que de 30 muestras, 17 fueron positivas, (56.66%) y 13 negativos, (43.33%). Se analizaron las variables como el sexo, la edad y la raza, además de la sinología clínica.

Palabras clave: Ehrlichia, Diagnóstico, Caninos, ELISA, Matamoros Coah.

II. INTRODUCCIÓN

La primera Ehrlichia que se descubrió fue *Ehrlichia canis*, una bacteria Gram negativa, cocoide pleomórfica pequeña que parasita en el citoplasma de los monocitos circundantes, en grupos denominados mórulas, en un perro pastor alemán en Argelia por A. Donatien y F. Lestocuard, investigadores franceses 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 esta reconocida en todo el mundo, como una enfermedad infecciosa causado una extensiva morbilidad y portabilidad entre perros domésticos, y otros caninos, y se le conoce también con los nombres de Pancitopenia tropical canina, Rickettsiosis canina, Enfermedad del perro rastreador, Tifus de la garrapata, Desorden hemorrágico de Nairobi, Fiebre hemorrágica canina y Fiebre de garrapata. Los huéspedes vertebrados de *Ehrlichia canis* se han limitado a miembros de la familia canina, además del perro domestico, 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. Sin embargo en los casos que ocurren en forma natural, es difícil asignar con precisión de la enfermedad. 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 presencia de 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. 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 y afección de la retinas, se han observado convulsiones, estupor, ataxia, anisocoria. El diagnóstico se realiza a través del examen clínico, anomalías, 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 enzima (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, etc. El tratamiento de la ehrlichiosis canina incluye medicamento 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 de infección de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en nuestros perros y en 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 99.9% a la Ehrlichiosis monocítica humana con la *Ehrlichia canis*.

III. INTRODUCCION AL PROBLEMA

En la ciudad de Matamoros Coahuila, al igual que todo el estado y la Comarca Lagunera, existe un alto grado de incidencia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. (Fig. 1). 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 Matamoros Coah.



Fig. 1

IV. ANTECEDENTES

En el Norte de Australia se realizó un 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, Kununrura y Boroombe, 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, siete reaccionaron a la fluorescencia indirecta de anticuerpos. Para *Ehrlichia canis* aguda o crónica, un perro fue sacrificado, los otros seis se elevaron por medio de la técnica de PCR, dando negativo a Ehrlichiosis 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 de anticuerpos e infección de garrapatas. Los títulos significativos de tres perros que experimentaron 2 infestaciones con garrapatas adultas fueron incrementando transitoriamente después de la segunda infección.

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 mas altos que los perros con garrapatas. La conclusión fue que la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se puede relacionar con *Ehrlichia canis* en Japón (Inhuma y col., 2000).

En Baja California México se realizó un trabajo que corresponde a un ensayo clínico, de tipo observacional 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 a *Rickettsia rickettsii* y el 6.6% (2) a *Borrelia burgdoferi* (lyme). Solamente en un paciente se pudo observar la formula de microorganismo intracitoplasmáticamente en un monolito por medio del frotis sanguíneo. Se puede mencionar como datos adicionales que la Ehrlichiosis canina monocítica es una enfermedad infectocontagiosa y la sinología mas 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 Okinawa y esta relacionado con varios patógenos. Este trabajo trata de evaluar a los perros con *Rhipicephalus sanguineus* de Yamaguchi y otros vecindarios para la prevalencia de *Ehrlichia canis*. Se tomarán por 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 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. Unos perros con problemas clínicos y otros normales. La historia y la observación física indicaban infecciones por garrapatas (Inokuma y col., 1999).

Factor		No	No. Caso positivo (%)
	Total	430	20 (4.7)
Sexo	Macho	232	10 (4.3)
	Femenino	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)
	12-	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 raza (Inokuma y col., 1999).

En Portugal, se examinó la prevalencia de *E. canis*, *R. conorii*. Y *A. phagocytophilum* en perros de la zona metropolitana de Oporto, así como determinar algunos factores de riesgo, recolección de muestras de sangre a 142 perros, entre octubre y diciembre de 2009 y la búsqueda de anticuerpos anti – *e. canis*, anti – *r. conorii* y anti- *a. phagocytophilum*.

Los objetivos fueron alcanzados, seroprevalencias de 10% a *phagocytophilum a.*, de 11.4 a *e. canis* y 37,1% para *r. conorii* y concluir que existe una correlación significativa entre la edad de los animales y el resultado de la serología para *r. conorii* (Correia E, 2010).

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 sistémicas 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 phagoocytophila*, que en su marcador sustituye al agente de la Ehrlichiosis granulocítica.

Veintidós de 996 positivos a *Ehrlichia phagoocytophila*, 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).

V. HISTORIA

La primera *Ehrlichia* que se descubrió fue *Ehrlichia* en un perro pastor alemán en Argelia por A. Donatien y F. Lestoquard investigadores franceses en 1935 (Mandaluniz y col., 1997; Harrus y col., 1999; Correia E. 2010).

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 esta 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).

VI. ETIOLOGÍA

La Ehrlichiosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por microorganismo intracelulares obligados del genero *Ehrlichia canis* de la familia rickettsiaceae (Neer, 2000).

VII. SINONIMIAS

Pancitopenia tropical canina, fiebre de garrapata, Rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi (Bowman, 1995, Harrus, 2000).

VIII. EPIDEMIOLOGÍA

Los huéspedes vertebrados de *Ehrlichia canis* se han limitado a miembros de la familia canina, además del perro domestico, 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 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* es capaz de transmitir *Ehrlichia canis*. También puede ser transmitida *Ehrlichia canis* por transfusión de sangre contaminada (Harrus y col., 1999).

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

Se trata de una especie que muestra preferencia por construcciones humanas y las zonas urbanas, donde hay un mínimo de vegetación, como parques públicos y jardines privados, donde quiera que viven o pasan de perros. Los ixodídeos puede colonizar caninos y casas, desarrollos permanentes y poblaciones estables (Correia E. 2010).

8.1 Ciclo Biológico de *Rhipicephalus sanguineus*.

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

Las larvas eclosionan entre los 8-67 días (periodo de incubación) y después de un periodo de maduración, están capacitadas para fijarse en un primer hospedador; esta fase presenta un periodo de supervivencia que, en condiciones favorables, pueden sobrepasar los 253 días. Entre los 3 y los 7 días posfilación 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 los 4 y los 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 emergen los adultos entre los 12 - 129 días después de la caída de la ninfa repleta; pueden sobrevivir mas de 568 días en espera de un hospedador. Tanto los machos como las hembras se fijan en un tercer hospedador para realizar la ingestión de sangre (Browman, 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).



Fig. 2 Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

IX. PATOGENIA

La infección del huésped vertebrado ocurre cuando una garrapata infectada ingiere sangre y sus secreciones salivales contaminan al sitio en donde se alimentan. El microorganismo también se transmite por transfusiones sanguíneas de donadores infectados. El curso subsecuente de a Ehrlichiosis se ha dividido en tres frases: aguda, subclínica y crónica, basándose en los signos clínicos y las anomalías clinicopatológicas. Sin embargo, en los casos que ocurren en forma natural, es difícil asignar con precisión de la enfermedad (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 monoculares por fisión binaria y se disemina a la totalidad del cuerpo. Luego colonizan los órganos del sistema fagocítico mononuclear (SFM), como bazo, hígado, medula ósea y nódulos linfáticos, donde provocan una hiperplasia y en los endotelios vasculares una consecuente vasculitis e inflamación de estos órganos, es común encontrar garrapatas en el perro (Harrus, y col, 2000; 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).

Los signos clínicos de la fase aguda varían en severidad, pero usualmente se resuelven espontáneamente aunque algunos perros pueden permanecer con infección subclínica. Puede haber recuperación espontánea del estadio subclínico, sin embargo otros animales pueden ser portadores persistentes durante meses o años. (Harrus y col 2000).

La fase subclínica con un periodo de incubación de 20 a 4 días, se establece cuando el animal sobrevive a la fase aguda y se caracteriza por la persistencia de 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 presentara la fase crónica de la infección (Neer, 2000; Sainz y col., 2001).

La identificación de ADN de *Ehrlichia* en aspirados esplénicos, obtenidos de 4 portadores persistentes después de 34 meses de la infección experimental, sugiere que el bazo es el órgano donde permanece la rickettsia en los casos subclínicos. Se cree que los perros inmunocompetentes son capaces de eliminar al agente durante esta fase (Harrus y col 2000).

Algunos perros persistentemente infectados pueden desarrollar subsecuentemente la fase severa crónica de la enfermedad. No todos los perros desarrollan la fase crónica de EMC, y las condiciones que llevan al desarrollo de la misma permanecen poco claras. El Pastor Alemán tiende a desarrollar la fase crónica mucho más frecuentemente que otras razas, posiblemente debido a una respuesta disminuida de la inmunidad celular en estos perros. La muerte en la EMC puede suceder como consecuencia de las hemorragias y/o infecciones secundarias (Harrus y col, 2000).

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 las enfermedades es mayor con ciertas cepas del microorganismo, cuando hay una enfermedad concomitante en algunas razas y en animales más jóvenes (Neer, 2000).

X. SINOLOGIA

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, No hay predilección sexual ni de edad en la infección con *E. canis* y todas las razas pueden ser infectadas. Sin embargo el Pastor Alemán parece ser el más predispuesto a desarrollar EMC clínica (Harrus y col, 2000; Neer, 2000).

10.1 Signos Multisistémicos

Un cuadro común en la depresión, letargo, fiebre, poca pérdida y anorexia con tendencia hemorrágica 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 mas frecuente la epistaxis. El examen físico de estos pacientes también suele relevar linfadenomegalia y esplegnomegalia en 20 y 25% respectivamente. Los signos respiratorios y cardiacos relacionados entre sí pueden ocurrir debido a hemorragias y como consecuencia de la anemia, que puede llegar a ser grave (Harrus y col., 1998; Russell, 1999; Tiller, 2000; Neer, 2000; Ford 2002).

10.2 Signos Oculares

Son frecuentes, 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).

10.3 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 con disfunción de neurona motora alta o baja, disfunción vestibular aguda central periférica, anisocoria, disfunción cerebrosa, temblor de intención e hiperestesia generalizada o localizada (Neer, 2000; Ford, 2002).

10.4 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 neutrofilicos en la articulación (Neer, 2000).

XII. DIAGNÓSTICO

La mayoría de los casos de EMC ocurren en área endémicas durante la primavera y los meses de verano cuando la población de garrapatas es más activa. El diagnóstico de la EMC se basa en la anamnesis, presentación clínica, hallazgos patológicos al examen clínico y se confirma con las pruebas de laboratorio. Los propietarios pueden relatar una infestación previa con garrapatas o la visita reciente a un área endémica (Harrus y col, 2000).

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).

11.1. Hematología

Las alteraciones hematológicas se comprueban mejor en infecciones por *Ehrlichia canis* e incluyen anemia (82%) que suelen 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 sólo por que la cuenta de plaquetas es normal. Es necesario llevar serología si hay signos clínicos compatibles (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).

11.2. Bioquímica

Las anomalías químicas séricas más frecuentes han incluido hiperproteinemia en un (33%), hiperglobulinemia (39%), hipoalbuminemia (43%). Resultados de valores elevados de globulina (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).

Otros datos incluyen proteinuria, hematuria y tiempo de sangrado prolongado (incluso en ciertos perros con cifras con plaquetas normales). Observándose una pérdida máxima de proteínas, especialmente de albúmina, dos y media a tres y media semanas después de la inoculación que se resuelve alrededor de seis semanas después de la infección. Durante la pérdida máxima, la relación proteína/creatinina urinaria variaron de 4.5 a 23.2 (relación normal ≤ 1.0) (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).

11.3. 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 (Fig. 3). Es difícil y requiere tiempo encontrar mórulas, pero se logra óptimamente con frotis de la capa leucocitaria o examinando frotis sanguíneos delgados obtenidos de un lecho capilar periférico del borde de la oreja. Es posible observar mórulas en el interior de neutrófilos que se encuentran en el frotis de sangre periférica (Harrus y col., 1996; Neer, 2000).

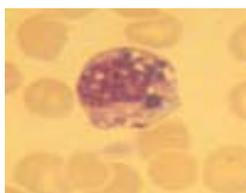


Fig. 3. Mórula de Ehrlichia en células mononucleares circulantes en un perro infectado (Giemsa).

11.4. 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 tornen 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 posinfección. 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 de IgG después de 20 días suele considerarse como prueba de infección, exposición, o ambas, pero es posible que este dato varíe con el método 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).

11.5. Inmunoblot y Reacción en Cadena de Polimerasa

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. Los inmunoblot para *Ehrlichia canis* muestran varios antígenos de reacción y los más prominentes son los que se separan en una banda ancha a 22kd. 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 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* tendrá títulos positivos de fluorescencia indirecta de anticuerpos a *Ehrlichia canis* y no se dispone de una prueba de fluorescencia indirecta 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).

Otro método utilizado en la actualidad es la detección de ADN agente a través del método de PCR. Esto muestra cómo claves ventajas a su alta especificidad y sensibilidad, tanto en animales como vectores, que permite para detectar la enfermedad en la fase aguda es todavía en pre-patencia anticuerpos y que permiten la identificación específica del agente causal por secuenciación. Como desventajas presentan a ser un método caro, que requieren equipos de laboratorio y conocimientos técnicos. Aún así, un resultado negativo puede no excluir la presencia de infección y, cuando sea posible, estar asociado con un método serológico (Correia E, 2010).

11.6. Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA).

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 ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar 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 marcador. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra midiendo espectrofotométricamente la cantidad del producto enzimático resultante y se cuantifica (Alleman y col., 2001).

XII. 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 mas comunes, pero también cabe señalar otras enfermedades infecciosas como Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, Babesiosis, Ehrlichiosis canina granulocítica, 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).

XIII. HISTOPATOLOGÍA

Los hallazgos histopatológicos a simple vista en perro 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 se hallan crecidos todos los nódulos linfáticos y tengan un color pardusco. Un dato adicional en casos crónicos es emanación con pérdida del estado corporal total. La médula ósea es hiper celular 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 piel y 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 perivasculares, sólo ocurre una encefalitis muy leve del cerebro. En casi todos los perros se encuentran en 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 acumulación subendotelial de células mononucleares y es posible observar hemorragias intersticiales y alveolares. Pueden también encontrarse microorganismos *Ehrlichia canis* en macrófagos del endotelio vascular pulmonar (Neer, 2000).

En las lesiones renales se incluyen una vasculitis con filtrado de las células plasmáticas localizadas en la unión corticomedular, en los perros con ehrlichiosis ocurre glomerulonefritis y plasmatisis 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).

XIV. 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 el pronóstico (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 o intracelulares altas, que pueden administrarse por un tiempo más corto que la tetraciclina y ser más eficiente (Harrus y col., 1998; Neer, 2000; Plumb, 1999; Max y col., 1999).

En los perros con la enfermedad en la fase aguda o 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 ese 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 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 la 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 dos dosis de 5 mg/kg dos veces al día y 10 mg/kg dos veces al día PO durante 21 días (Neer, 2000).

Fármaco	Dosis (mg/kg)	Vía Preferirá	Intervalos (hrs)	Duración (Días)
Tetraciclina	22	PO	8	14-21
Oxitetraciclina	25	PO	8	14-21
Doxiciclina	5-10	PO	12-24	14-21
Minociclina	10	PO	12	21
Dipropionato de semanas Imidocarb	5-6	IM	Una vez	Repetir en Dos

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

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

XV. 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 oxitetraciclina es un medicamento profiláctico eficaz contra la infección inicial o la reinfección cuando se administra por vía oral a dosis de 6.6 mg/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. Detectar los perros infectados por diagnóstico (ELISA), siguiendo esta guía, debe de 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 (Harrus y col 2000; 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 (Castella, 1999).

La mejor prevención de estas enfermedades se basa en la aplicación de medidas higiénicas y educativas. Se recomienda encarecidamente el uso de antiparasitario externo (perros y otras mascotas) especialmente en los meses de mayor prevalencia de ectoparásitos hematófagos (Correia E, 2010).

En ambientes infestados puede emplearse las fumigaciones con carbaril, permetrinas, resmetrina, piretrinas, etc. 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 realizar las mudas y estén al abrigo de los garrapaticidas (Castella, 1999).

COMPUESTO	SUSTANCIA	PRESENTACIÓN
-----------	-----------	--------------

Formanidina	Amitraz al 12.5%	Concentrado emulsionable
Organoclorados	Lindano	Concentrado emulsionable
Organofosforados	Coumaphos 1%	Jabón barra
	Coumaphos 20%	Polvo
	Coumaphos 50%	Concentrado emulsionable
Piretrinas	Permetrina	Concentrado emulsionable

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

SUSTANCIA	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 las garrapatas en perros (Ballweber 2002).

XVI. IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA

La Ehrlichiosis canina es una enfermedad con 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 ha relacionado en un 99.9% a la ehrlichiosis monocítica humana con la *Ehrlichia canis* (Unver y col., 2001).

XVII. 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 podremos 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 por *Ehrlichia canis*, podemos aumentar las medidas de prevención y el control evitando así las infecciones zoonóticas.

XVIII. OBJETIVOS

18.1. Objetivo General

Detectar la evidencia de anticuerpos de la *Rickettsia Ehrlichia canis* en caninos de la Ciudad de Matamoros Coahuila, procedentes de las colonias Aureliano Barajas, Maravillas y Santa Cecilia.

18.2. Objetivo Específico

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

XIX. META

Diagnosticar por el método de ELISA a 30 caninos sospechosos de la enfermedad Ehrlichiosis canina en la Ciudad de Matamoros Coahuila.

XX. HIPÓTESIS

Los caninos sospechosos a la enfermedad Ehrlichiosis canina y con antecedentes o la presencia de la garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*), el 50% de ellos son positivos a los anticuerpos de *Ehrlichia canis*.

XXI. MATERIALES Y MÉTODOS

Material utilizado:

30 tubos vacutainer con anticoagulante EDTA.

2 pipetas

30 dispositivos Snap 4Dx

La toma de la muestra se realizó por venopunción de la vena safena con ayuda de una aguja vacutainer y un tubo de ensayo con anticoagulante EDTA.

Estas muestras fueron sometidas a la prueba serológica Snap 4Dx como método de diagnóstico para la detección de anticuerpos de *Ehrlichia canis*.

Método:

Se trabajó con 30 muestras de sangre completa proveniente de 30 caninos diferentes, sospechosos a la enfermedad de ehrlichiosis canina. El procedimiento fue de la siguiente manera, se tomó una muestra sanguínea del tubo vacutainer con anticoagulante EDTA; utilizando una pipeta suministrada y se le agregaron 2 gotas de muestra (sangre completa) al tubo para muestra (vial), se agregaron 5 gotas de conjugado (Ag/Ac) al tubo para muestra que contiene la sangre, manteniendo el frasco del conjugado en posición vertical para un goteo preciso, se tapó el tubo de la muestra, suavemente invirtiéndolo de 3 a 5 veces (Fig. 4). Se mezcló bien.



Se colocó el dispositivo sobre una superficie plana, posteriormente se agregó el contenido completo del tubo al pozo para muestra, a continuación la muestra pasó por la ventana de resultados y llegó al círculo de activación en aproximadamente 30 segundos a 2 minutos, puede quedar un poco de muestra en el pozo para muestra, pero esto no altera el resultado (Fig. 5).



2. Reagent is added to blood

Cuando apareció el color por primera vez en el círculo de activación se oprimió firmemente el activador hasta que quedara al ras con el cuerpo del dispositivo. Algunas muestras podrían no fluir al círculo de activación en 2 minutos y, por lo tanto, el círculo podría no tornarse de color en 2 minutos. En este caso se oprime el activador después de que la mezcla haya fluido por la ventana de resultados (Fig.6).



3. Blood is added to SNAP test

Por último se espero el resultado alrededor de un tiempo de 8 a 10 minutos y se interpreto el resultado final (Fig.7), comparándolo con la hoja de resultados que cita el proveedor del producto.



Results: positive (left) negative (right)

XXII. RESULTADOS

De las 30 muestras de sangre entera provenientes de distintos caninos de la ciudad de Matamoros, Coahuila, México y que eran sospechosos a la enfermedad de Ehrlichiosis canina causada por *Ehrlichia canis*, 17 muestras (56.66%) en total resultaron positivas a antígenos de *Ehrlichia canis*, y 13 negativas (43.33%) lo cual es un numero considerable para la población canina de esta ciudad (Cuadro 5).

Factor		No.	No. Caso positivo (%)
	Total	30	17 (56.66)
Sexo	Macho	16	10(78.94)
	Hembra	14	7(50.00)
Edad (años)	0-24	8	5(62.5)
	2-4	7	5(71.42)
	4-6	7	3(71.42)
	6-8	2	1(5.0)
	8-10	3	1(33.3)
	10-12	1	1(10.0)
	12-	2	1 (5.0)

Raza	Bull terrier ingles	1	0(0.0)
	Chow chow	1	1(10.0)
	Labrador	2	1(5.0)
	Schnauzer	1	0(0.0)
	Baset hound	2	2(10.0)
	Poodle	5	2(40.0)
	Boxer	4	2(5.0)
	Rottweiler	3	1(33.3)
	Pastor Alemán	3	2(66.6)
	Cruza	8	6(75.0)

Cuadro 5. Caninos positivos a anticuerpos de *Ehrlichia canis*.

XXIII. DISCUSIÓN

De acuerdo con Sainz y col. (2000), el cuadro clínico que a menudo más se encuentra es bastante inespecífico y es fiebre, pérdida de peso, apatía y anorexia, se encuentra un 40% la linfadenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia, además de un típico cuadro hemorrágico en un 35%, presentándose como petequias y equimosis en la piel y en las mucosas, melena, hemorragias retinianas o conjuntivales; la epistaxis es la más común. La conclusión en nuestro trabajo indican similares resultados, con 80% con pérdida de peso, 10% con linfadenomegalia, además de palidez de mucosas, depresión y anorexia. En México, en Baja California, los signos observados con más frecuencia fueron similares, epistaxis, pérdida de peso, palidez de mucosas, anorexia y depresión (Romano, 1998).

Pusterla y col. (1998) en suiza, de 996 muestras que examinaron por la técnica de inmunofluorescencia, para detectar anticuerpos de *Ehrlichia canis*, encontraron 22(2.2%) positivas. Por otra parte, Masón y col. (2001), en Australia examinaron 316 muestras por la técnica de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos de *Ehrlichia canis*, de las cuales 7 solamente resultaron positivas, sin embargo, con estudios de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resultaron negativos. En este estudio los resultados difieren mucho ya que fue de 63.3% la positividad. No obstante, en Carolina del Norte, Kordick y col. Encontraron similares porcentajes de 55%.

En otros estudios en México 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 este 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 (Mason, 2001), más sin embargo, en nuestro medio es común el vector que es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

XXIV. LITERATURA CITADA

1.- Alleman A, McSherry L, Barbet A, Breitschwerdt E, Sorenson H, Bowie M, and Bélanger M. 2001. Recombinant Major Antigenic Protein 2 of Ehrlichia canis; a Potential Diagnostic Tool. J Clin Microbiol. 39(7):2994-2499.

2. - Ballweder L, 2002. Flea control offers better protection for pets, humans from 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.- Correia E, 2010. Ehrlichia canis, Rickettsia conorii e anaplasma phagocytophilum. Estudio da prevalencia por IFI e PCR em população canina da área metropolitana do Porto, Instituto de ciencias biomédicas Abel Salazar Universidad do Porto. p.6-8

7. - Etting S, and Felman E, 2000. Diseases of the dog and cat. Textbook of Veterinary internal medicine. 5th ed. Edit. Saunders USA. p. 402-405.

8. - 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.

9. - Glynn K, Krammer V, and Vugia D, 1996. Human ehrlichiosis: new emerging tick-borne disease in California, in California Morbidity. Division of Communicable Disease Control. <http://www.msosquito.com/ehrllich.html>.

10. - 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.
11. - 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.
12. - Harrus S, Ofri R, 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.
13. - Harrus S, Waner T, 2000. Ehrlichiosis monocítica canina Recent Advances in canine infectious disease, institute for biological Research Nes, p.1-5 www.ivis.org
- 14.- 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.
15. - 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.
- 16.- Harrus S, Waner T, Yaakov A, Eitan B, Huo-chen P, and Bark H, 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 66: 241-249.
17. - Inokuma H, Ohna K, and Onishi T, 2000. Is detection of anti-*Rhipicephalus sanguineus* (Rs24p) Antibodies a valuable epidemiological tool of tick infestation in dogs. *Vet Res.* 31: 365-369.
18. - 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.
- 19.- Kordick S, Breitschwerdt E, Hegarty B, Southwick K, Colitz C, Hancock S, Bradley J, Rumbough R, Mcpherson J, and MacCormack J, 1999. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol.* 37(8): 2631-2638.
- 20.- 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>.
- 21.- Mason R, Lee J, Curran J, Moss A, Van D, 2001. Serological of survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs for the major population centers of northern Australia. *Aust Vet J.* 79(8): 559-562.
- 22.- Max J, Breitschwerdt B, Chomel B, Eschner A, and Neer T, 1999. Rountable on tcks and tick transmitted diseases. *Vet Forum.* 16(4): 38-45.
23. - Mc Brid J, Corstvet R, Breitswerdt E, and Walker D, 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection with Recombination Proteins. *J Clin Microbiol.* 39(1): 315-322.

- 24.- 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.
- 25.- 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 Recombinant Protein for Serodiagnosis. J Clin Microbiol. 36(9): 2671-2680.
26. - Plumb D, 1999. Drug hand book, 3rd ed. Edit. Saunders Company USA, p.229-231.
- 27.- 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): 3460-3462.
- 28.- 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.
- 29.- Russel T, 1997. Ehrlichiosis canina: implicaciones clínicas de factores humorales, en Terapéutica veterinaria de pequeños animales. Kirk R, y Bonagura J, 12ª ed. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana México. P317-320.
- 30.- Sainz A, Rodríguez F, 2000. La ehrlichiosis en el perro: presente y futuro. Colegio oficial de veterinarios de Madrid España. http://colvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm.
31. - Slatter in collaboration with Dr. Chambers E, 1990. Fundamentals of veterinary ophthalmology. 2nd ed. Edit. Saunders Company USA. p.514-517.
32. - Stades F, Nuuman H, and Wyman M, 1998. Oftalmología para el veterinario practico. Edit. Intermédica Buenos Aires Argentina. p. 147.
33. - 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.
- 34.- 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.
- 35.- Unver A, Perez 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.
36. - 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.
- 37.- 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.

38. - 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.