

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



DIAGNOSTICO DE *Ehrlichia cannis* POR EL SNAP 4 DX EN PERROS
QUE LLEGAN A CONSULTA EN LA CLINICA VETERINARIA

“El Lobo”

POR:

ERICK JESUS JUAREZ IBARRA

TESIS:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO, 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DIAGNOSTICO DE *Ehrlichia canis* POR EL SNAP 4 DX EN
PERROS QUE LLEGAN A CONSULTA EN LA CLINICA VETERINARIA
“El Lobo”**

POR:

**ERICK JESUS JUAREZ IBARRA
ASESOR PRINCIPAL**

MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DIAGNOSTICO DE *Ehrlichia cannis* POR EL SNAP 4 DX EN PERROS QUE
LLEGAN A CONSULTA EN LA CLINICA VETERINARIA**

"El Lobo"

POR:

ERICK JESUS JUAREZ IBARRA

**ELABORADO BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ PARTICULAR Y APROBADA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL TITULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

JURADO:


MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
PRESIDENTE


MVZ. SILVESTRE MORENO AVALOS
VOCAL


MVZ. EDMUNDO GÚZMAN RAMOS
VOCAL


MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ
VOCAL SUPLENTE


MVZ. RODRIGO SIDRO SIMÓN ALONSO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO, 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DIAGNOSTICO DE *Ehrlichia cannis* POR EL SNAP 4 DX EN PERROS
QUE LLEGAN A CONSULTA EN LA CLINICA VETERINARIA
“El Lobo”**

POR:

ERICK JESUS JUAREZ IBARRA

ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA

ASESOR PRINCIPAL:

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

ASESORES:

MVZ. SILVESTRE MORENO AVALOS

MVZ. EDMUNDO GUZMAN RAMOS

MC. JORGE ITURBIDE RAMIREZ

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2012

INDICE GENERAL	PAG.
DEDICATORIA.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	10
OBJETIVOS.....	11
Objetivo General.....	11
Objetivo Especifico.....	11
HIPOTESIS.....	11
JUSTIFICACION.....	12
I. INTRODUCCION.....	13
II. RESUMEN.....	15
III. INTRODUCCION AL PROBLEMA.....	16
IV. INFORMACION GEOGRAFICA DE LA COMARCA.....	17
4.1 Geografía.....	17
4.2 Conglomerado de Torreón.....	18
4.3 Clima.....	19

V. ANTECEDENTES.....	20
VI. HISTORIA.....	24
VII. SINONIMIOS.....	25
VIII. ETIOLOGIA.....	26
IX. EPIDEMIOLOGIA.....	27
9.1. Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus sanguíneo</i>	28
X. PATOGENIA.....	29
XI. SIGNOS.....	31
11.1. Signos multisistemicos.....	31
11.2. Signos oculares.....	31
11.3. Signos neurológicos.....	32
11.4. Poliartritis.....	32
XII. DIAGNOSTICO.....	33
12.1. Hematología.....	33

12.2. Bioquímica.....	33
12.3. Frotis.....	34
12.4. Serología.....	34
12.5. Inmunoblot y Reacción de Cadena de Polimerasa.....	35
12.6. Inmunoensayo ligado a Enzima (ELISA).....	36
XIII. DIAGNOSTICO DIFEERENCIAL.....	37
XIV. HISTOPATOLOGIA.....	38
XV. TRATAMIENTO.....	40
XVI. PREVENCION.....	42
XVII. IMPORTANCIA EN LA SALUD PUBLICA.....	44
XVIII. MATERIALES Y METODOS.....	45
18.1. Material.....	46
18.2. Almacenamiento.....	46
18.3. Componentes del Kit.....	46
18.4. Información de muestra	47

18.5. Procedimiento de análisis.....	47
18.6. Interpretación de los resultados de los análisis.....	51
18.6.1. Resultado positivo.....	51
18.6.2. Resultado negativo.....	52
18.6.3. Resultado invalido.....	53
XIX. RESULTADOS	54
19.1. Graficas.....	54
Grafica 1.....	58
Grafica 2.....	59
Grafica 3.....	61
Grafica 4.....	62
Grafica 5.....	63
TABLA DE SIGNOS.....	64
XX. DISCUCIONES.....	66
XXI. CONCLUSION.....	67
XXIII. LITERATURA CITADA	67

DEDICATORIA

A MIS PADRES

No hay palabras que describan lo importante que son en mi vida y lo agradecido que estoy por brindarme su apoyo, su amistad, y sobre todo su amor incondicional. Gracias por cada consejo, cada palabra y ejemplo para salir adelante y en especial a mi madre que siempre nos estará cuidando en donde estemos. Gracias papas. VICTOR JESUS JUAREZ CARMONA Y MARIA DE JESUS IBARRA ARAMBULA

A MIS HERMANOS

YOSAFAT QUETZALCOALT JUAREZ IBARRA, NEFTALI IXBALANQUE JUAREZ IBARRA

A MI NOVIA

Que siempre estuvo con migo apoyándome y ayudándome en todos los aspectos malos y buenos gracias MARTHA LIZETH LOPEZ ZAMORA

A MI FAMILIA

IBARRA ARAMBULA Y JUAREZ CARMONA

AGRADECIMIENTO

Quiero dar las gracias a todas aquellas personas que me apoyaron para llevar acabo mis estudios universitarios como médico veterinario zootecnista

A mi asesor principal

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

ASESORES

MVZ. SILVESTRE MORENO AVALOS

MVZ. EDMUNDO GUZMAN RAMOS

MC. JORGE ITURBIDE RAMIREZ

En particular a la veterinaria el lobo por darme la oportunidad de realizar las pruebas de la tesis

MVZ. RAUL CARLOS RODRIGEZ VILLA

SR. JANNETTE SANCHES DE LEON

OBJETIVO

Objetivo General

Búsqueda específica de la enfermedad Ehrlichia canis en perros que lleguen a la clínica "El Lobo" a la consulta.

Objetivo Especifico

Realizar el SNAP 4DX en muestra de sangre entera en perros sospechosos que pudieran tener la enfermedad Ehrlichia canis.

HIPOTESIS

Los perros sospechosos a la enfermedad Ehrlichia canis, con antecedentes o la presencia de la garrapata (*Rhipicephalus sanguíneos*), en el 70% de los casos que llegan a consulta son positivos.

JUSTIFICACION

La necesidad de la presente investigación sobre el diagnóstico de Anticuerpos de Ehrlichia canis por el método de prueba rápida SNAP 4DX, 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 oportuno y eficaz que nos lleve a un pronóstico favorable para los perros enfermos.

A lo que concierne con la Salud Pública, a través de este método, podremos prevenir la propagación de dicha enfermedad y aumentar los medios de prevención y control evitando así las infecciones zoonóticas.

I. INTRODUCCION

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 anomalías 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, 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 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*.

II. RESUMEN

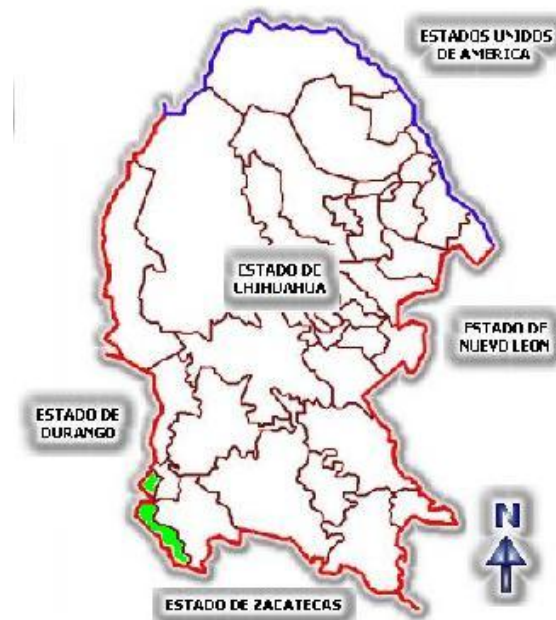
En el presente trabajo, se evaluaron 50 muestras de sangre completa con el apoyo de la prueba rápida SNAP 4DX, provenientes de 50 perros diferentes de la Comarca Lagunera sospechosos a la enfermedad de Erlichiosis canina.

De las 50 muestras de sangre analizadas se descubrió que no solamente dieron positivo a Ehrlichia canis sino también para Dirofilariasis canina, arrojando un resultado de 38 pruebas positiva para E.canis, 7 absolutamente negativas, 5 positivas a Dirofilaria immitis y de las 38 muestras que resultaron positivas a E. canis, 3 de ellas salieron positivas a Dirofilaria y E. canis.

III. INTRODUCCION AL PROBLEMA

En la Ciudad de Torreón Coahuila y Gómez Palacios Durango México al igual que en los municipios que conforman La Comarca Lagunera, 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 *E. canis*. Con respecto a lo anterior, sospechamos de una incidencia considerable de *E. canis* en La Comarca Lagunera.

IV. INFORMACION GEOGRAFICA DE LA COMARCA LAGUNERA



4.1. Geografía

El municipio de Torreón es una ciudad de México, situada al norte del país, en el Estado de Coahuila; específicamente en la parte oeste sur de este estado norteño.

Limita al norte y al este con el municipio de Matamoros; al sur y al oeste con el estado de Durango. Se localiza a una distancia aproximada de 265 kilómetros de la capital del estado.

4.2. Conglomerado de Torreón



Comarca Lagunera.

El conglomerado de Torreón, formada por los municipios de Torreón y Matamoros en el Estado de Coahuila, así como Gómez Palacio, y Ciudad Lerdo, en el Estado de Durango, agrupaba en el año 2011 un total de 1 275 207 habitantes, distribuidos de la siguiente forma:



Ciudad	Población (habitantes)
Torreón	639.629
<u>Matamoros</u>	107.160
<u>Gómez Palacio</u>	327.985
<u>Lerdo</u>	141.043
Total Metropolitana	Zona 1.224.944

4.3. Clima

La región es de clima estepario, con escasas lluvias, apenas entre 100 y 300 mm como media anual; la mayoría de estas precipitaciones van desde abril hasta octubre. La temperatura promedio fluctúa entre los 0 y 40 grados centígrados, pero puede alcanzar hasta 44.4 °C (2011) en verano y -8.5 °C (2011) en febrero.

En algunos casos ha llegado a nevar, en las últimas décadas en 1997 y en 2004; aunque se han dado distintos tipos de precipitación de aguanieve y hielo. Sin embargo, la nieve es común en Ceballos, Durango. Ubicado apenas a 65 km de la Zona.

Los vientos generalmente provenientes del sur varían desde 20 hasta 44 kilómetros por hora y generalmente provocan tolveneras que cubren la visibilidad hasta algunos metros de distancia.

 Parámetros climáticos promedio de Torreón 													
Mes	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Anual
Temperatura máxima registrada (°C)	29	34	39	41	45	44	41	39	38	36	35	30	44
Temperatura diaria máxima (°C)	20	22	25	32	35	36	34	32	31	28	26	22	28
Temperatura diaria mínima (°C)	2	5	9	12	14	15	17	16	14	11	6	5	10
Temperatura mínima registrada (°C)	-7	-8.5	-5	1	4	10	11	10	7	4	-3	-8	-8
Precipitación total (mm)	12	3	1	7	34	39	45	38	49	19	9	15	243
<i>Fuente: ² 2009.02.13</i>													

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 Borome, 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 esté libre de *Ehrlichia canis*.

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.

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 sintomatología más frecuente que presentan los pacientes afectados fue epistaxis, pérdida de peso, palidez de mucosas, anorexia y depresión.

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. 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.

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.

VI. HISTORIA

La primera *Ehrlichia* que se descubrió fue *Ehrlichia canis* en un perro pastor alemán en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935.

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.

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.

VII. **SINONIMIAS**

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

VIII. 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. La transmite la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), aunque existen otras tres variedades de *Ehrlichia* que también pueden afectar a perros (*E. equi*, *E. platys*, y la *E. risticii*).

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.

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.

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.

9.1. 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 período de previa exposición variable de 3-83 días, en lugares protegidos de la luz.

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. 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.

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.

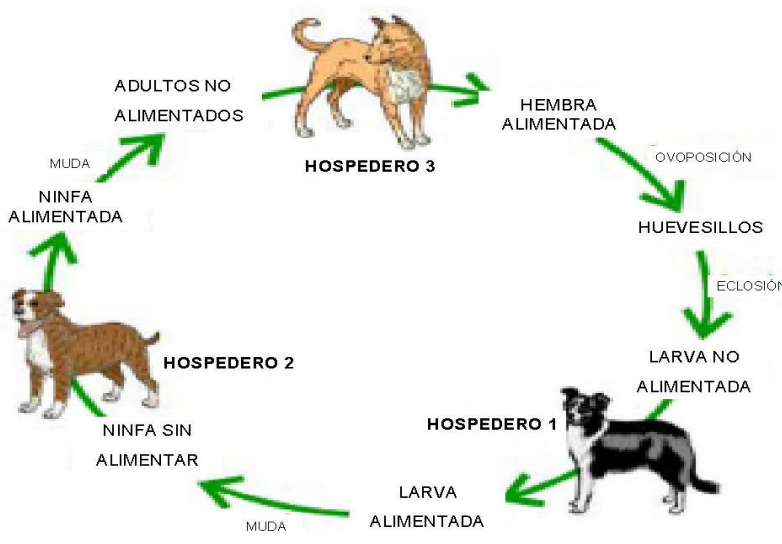


Figura 2. Ciclo vital de *Rhipicephalus sanguineus* (Lord, 2001)

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 cerebral, 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 hiperproteïnemia 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 (Fig.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 de 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. 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 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 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 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).

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 palidismo, exudado nasal seroso, diarrea y disnea (Neer, 2000).

Otro medicamento que se ha valorado es la Enrofloxacin para el tratamiento de la infecci3n por *Ehrlichia canis* a dosis de 10mg/kg dos veces al d1a PO durante 21 d1as (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. Terapeutica antimicrobiana para ehrlichiosis canina (Ford, 2002; Neer, 2000; Plumb, 1999; Max y col., 1999)

Adem1s de la terap1utica antimicrobiana, suele justificarse el tratamiento con l1quidos para deshidrataci3n o transfusiones sangu1neas 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 ha relacionado en un 99.9% a la ehrlichiosis monocítica humana con la *Ehrlichia canis* (Unver y col., 2001).

XVIII. MATERIALES Y METODOS

Se trabajaron con 50 muestras de sangre completa de diferentes perros de la Comarca Lagunera, se utilizo un método de diagnostico de prueba rápida que funciona con la fluorescencia indirecta de anticuerpos (SNAP 4DX) este kit es un diagnostico in vitro para la detección del antígeno de la *Dirofilaria immitis* (HW), anticuerpos frente a *Anaplasma phagocytophilum* (AP), anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* (LY) y anticuerpos frente a *Ehrlichia canis* (EC) en suero, plasma o sangre total canina.

18.1. Material

Se utilizo un kit para la detección de Antígeno de *Dirofilariasis immitis* (gusano de corazón canino)-Anticuerpos frente a *Anaplasma Phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi*-*Ehrlichia canis* (SNAP 4DX).

Para poder realizar esta prueba rápida hay que tener en cuenta los siguientes puntos antes de utilizarla.

18.2. Almacenamiento

- Almacenar a 2-8°C.
- Los dispositivos y reactivos SNAP pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-25°C) durante 90 días o hasta la fecha de caducidad impresa (de las dos, la fecha que se cumpla antes).
- Cuando los dispositivos y reactivos SNAP se retiran del lugar donde está a 2-8°C de temperatura durante más de 24 horas, la fecha de caducidad será de 90 días o la fecha de caducidad impresa (de las dos, la fecha que se cumpla antes). Si la fecha de caducidad de 90 días se cumple antes de la fecha de caducidad impresa, anote la nueva fecha en el espacio indicado en el kit.

18.3. Componentes del kit

Articulo	Reactivo	Cantidad
1	1 frasco de conjugado anti-HW/AP/LY/EC: HRPO	7,0 ml
2	Dispositivo SNAP	5,15 o 30
Cada dispositivo SNAP contiene 0,4 ml de solución de lavado y 0,6 ml de solución sustrato		
Otros componentes: pipetas cuentagotas, tubos de ensayo, y un soporte de reactivos		

18.4. Información de muestras

- Las muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de comenzar el procedimiento de análisis.
- Se pueden usar suero, plasma o sangre total anticoagulada (p.ej., EDTA, heparina), ya sea fresco o almacenado a 2-8°C durante una semana como máximo.
- Para un almacenamiento más prolongado, el suero o el plasma puede congelarse (-20°C, o a temperatura más fría). Habrá que volver a centrifugarlo antes de usarlo.
- La muestra hemolizadas o lipemicas no afectaran los resultados del análisis.

18.5. Procedimiento de análisis

1. Si los componentes están refrigerados, esperar a que se equilibren a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos. NO CALENTARLOS.

2. Seleccionar el área a punzar para tomar la muestra de sangre y extraer 1ml de sangre total.



Figura 1. Paciente

3. Con la pipeta del kit, verter 3 gotas de muestra en un tubo de ensayo nuevo.



Figura 2.

4. Agregar 4 gotas de conjugado al tubo de ensayo sosteniendo la botella en posición vertical.



Figura 3.

5. Tapar el tubo de ensayo y mezclarlo a fondo invirtiéndolo entre 3 y 5 veces.
6. Colocar el dispositivo sobre una superficie horizontal. Agregar todo el contenido del tubo de ensayo en el pocillo de muestras, teniendo cuidado de no verter el contenido fuera de dicho pocillo.



Figura 4.

La muestra fluirá por la ventana de resultados, alcanzado el círculo de activación en aproximadamente 30- 60 segundos. Es posible que quede algún resto de la muestra en el pocillo.



Figura 5.

7. En cuanto aparezca color en el círculo de activación, presionar el activador con firmeza hasta que quede al ras con el cuerpo del dispositivo.



Figura 6.

Nota: es posible que alguna muestra no fluya hacia el círculo de activación dentro de los 60 segundos, y, por lo tanto, el círculo no se coloreara. En ese caso, presionar el activador después de que la muestra haya fluido por la ventana de resultados.



Figura 7.

8. Leer los resultados del análisis cuando hayan pasado ocho minutos.



Figura 8.

18.6. Interpretación de los resultados de los análisis

18.6.1. Resultado positivo

Cualquier desarrollo del color en los puntos de la muestra indica la presencia de antígeno de la dirofilariasis canina, anticuerpo frente a *A. phagocytophilum*, anticuerpo frente a *B. burgdorferi* o anticuerpo frente a *E. canis* en la muestra.

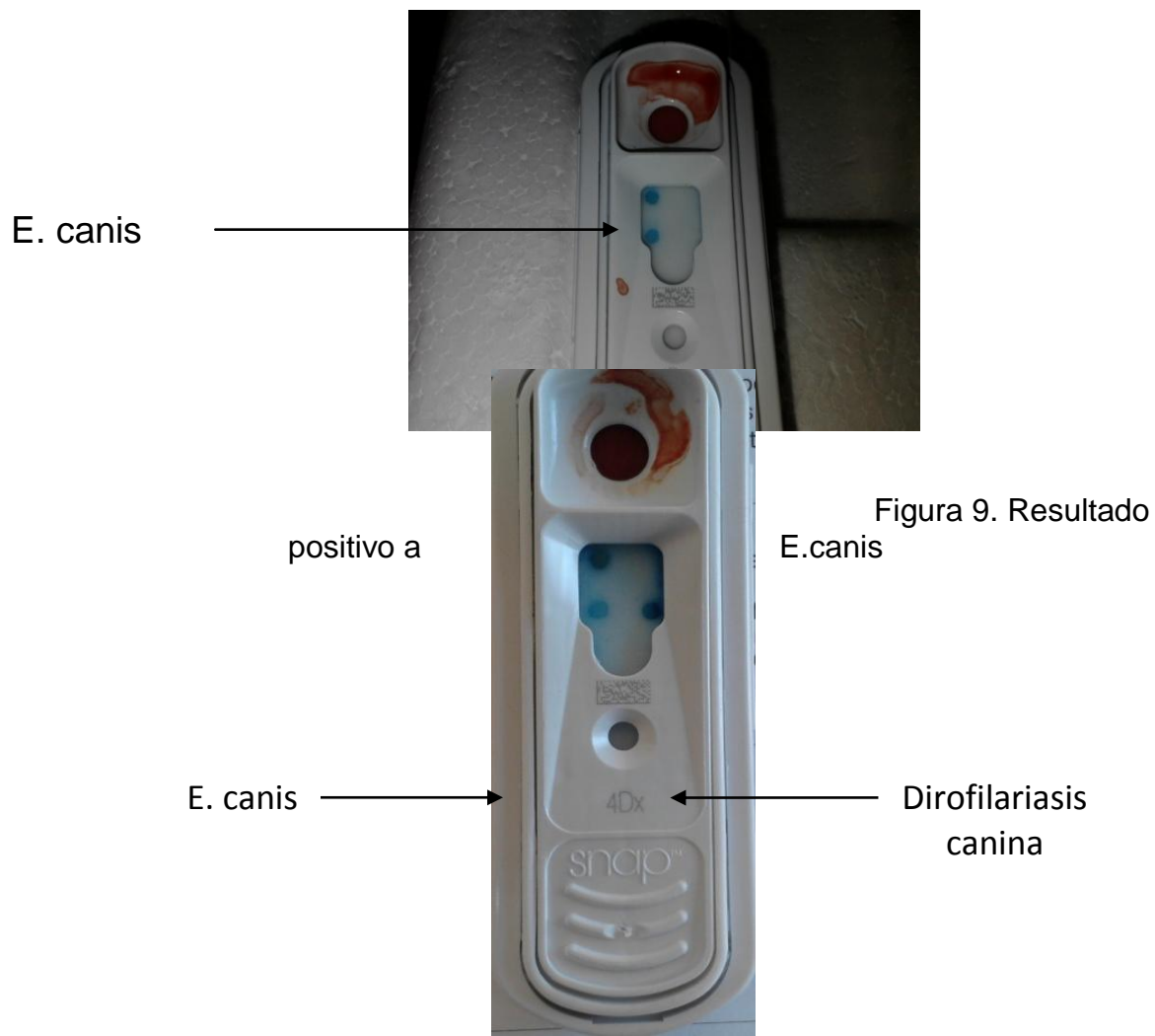


Figura 10. Resultado positivo a E. canis y Dirofilariasis canina

18.6.2. Resultado negativo

Solamente se produce color en el punto del control positivo.

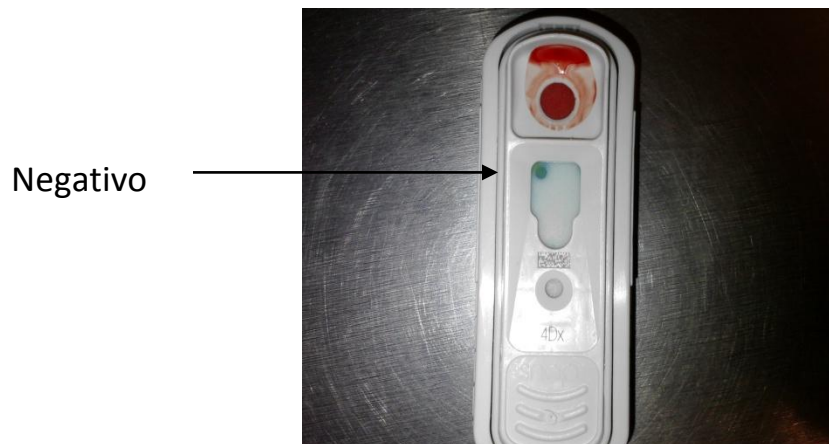


Figura 11.

18.6.3. Resultados inválidos

- Fondo- es posible que se produzca color de fondo si se permite que la muestra fluya sobrepasando el círculo de activación. Algo de color de fondo es normal. Sin embargo, si el color de fondo dificulta el resultado del análisis, repítalo.
- No se produce color- si en el punto del control positivo no produce color, repita el análisis.



Figura 12.

XIX. RESULTADOS

De las 50 muestras de sangre entera proveniente de distintos perros de la Comarca Lagunera, y que eran sospechosos a la enfermedad de Ehrlichiosis canina causada por Ehrlichia canis, 38 muestras en su total resultaron positivas al antígenos de Ehrlichia canis (76%), 12 negativas (24%) de entre las cuales 5 de los resultaron fueron positivos para Dirofilariasis canina (gusano del corazón canino) y 3 resultados de las 38 muestras salieron positivas para ambas patologías.

19.1. Graficas

Las siguientes graficas están basadas en los resultados que se obtuvieron de las muestras de los 50 perros sospechosos a E. canis., cada una se basa a su edad, sexo, raza y su localidad según la siguiente tabla de datos.

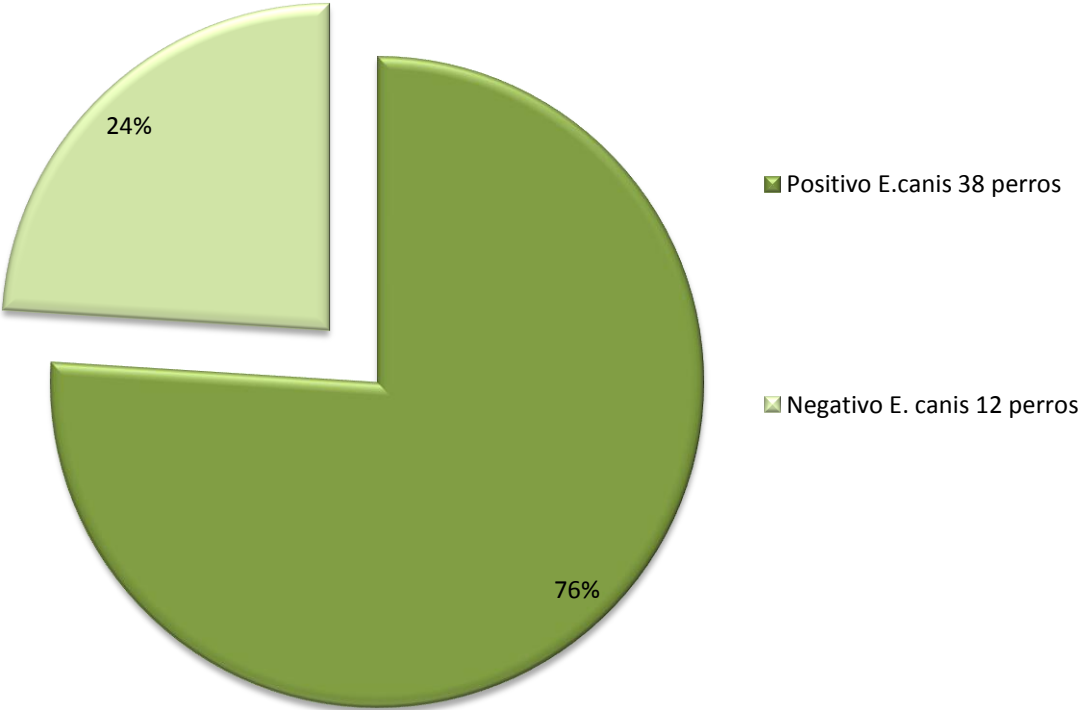
	NOMBRE DEL DUEÑO	RAZA	SEXO	EDAD	PESO	NOMBRE DEL PERRO	SNAP 4DX POSITIVO A:	LOCALIDAD
1	Sergio Perez Fraire	Pastor Aleman	Macho	2 años	32 kg	Oso	E. canis	Nuevo Mieleras
2	Sergio Perez Fraire	Pastor Aleman	Hembra	2 años	28 kg	Sami	E. canis	Nuevo Mieleras
3	Sergio Perez Fraire	Criollo	Hembra	1 año	15 kg	Niurka	E. canis	Nuevo Mieleras
4	Sergio Perez Fraire	Pastor Aleman	Macho	1 año	5 kg	Boby	E. canis	Nuevo Mieleras
5	Andrea Dominguez Atlixqueño	Criollo	Hembra	7 años	25 kg	Canela	E. canis	Valle Dorado
6	Katherin Marie Kalvei	Cocker	Hembra	8 años	5,600 kg	Lany	E. canis y Dirofilaria	Torreón Jardin
7	Fernando Gutierrez	Bull Terrier Ingles	Macho	3 años	19 kg	Marro	Negativo	San Pedro
8	Rocio Baladez	Pastor Aleman	Macho	2 años	34 kg	Oso	E. canis y Dirofilaria	Ejido La Popular Dgo.
9	Rocio Baladez	Rottweiler	Macho	4 años	38 kg	Negro	E. canis	Ejido La Popular Dgo.
10	Andrea Dominguez Atlixqueño	Criollo	Macho	3 años	7 kg	Peluso	E. canis	Valle Dorado
11	Unidad Canina K9	Labrador Negro	Hembra	3 años	30 kg	Negra	E. canis	Cereso Torreón
12	Unidad Canina K9	Pastor Belga	Macho	3 años	28 kg	Spock	E. canis	Cereso Torreón
13	Unidad Canina K9	Pastor Aleman	Macho	1 año	25 kg	Max	E. canis	Cereso Torreón
14	Unidad Canina K9	Labrador Café	Macho	2 años	28 kg	Jarry	Negativo	Cereso Torreón
15	Unidad Canina K9	Labrador Dorado	Macho	2 años	32 kg	Yury	Negativo	Cereso Torreón
16	Monica Cabral	Chihuahueño	Macho	6 años	2.500 kg	Terror	Negativo	Colonia Centro
17	Monica Vargas	Poodle	Hembra	7 años	2 kg	Doly	Negativo	San Isidro

18	Julio Cesar Sosa Rivera	Boxer	Macho	7 años	32 kg	Lucas	Negativo	Jardines Las Etnias
19	Javier Carreara Cordova	Bull Terrier	Macho	1 años	23 kg	Negro	E. canis	Campo Nvo. Zaragoza
20	Ivan Esparza Leal	Viejo Pastor Ingles	Macho	6 años	37 kg	Rofy	Dirofilaria	Ejido San Agustin
21	Ivan Esparza Leal	Schnauzer	Macho	6 años	12 kg	Rufo	Dirofilaria	Ejido San Agustin
22	Gabriela Aguirre	Poodle	Hembra	3 años	2 kg	Ambar	E. canis	Colonia Centro
23	Gabriela Aguirre	Poodle	Hembra	5 años	2.500 kg	Naomy	E. canis	Colonia Centro
24	Joaquin Hurtado	Criollo	Macho	7 años	27 kg	Body	E. canis	Colonia Centro
25	Maribel Vazquez	Poodle	Hembra	4 años	3.500 kg	Mimy	E. canis	Quinta Santa Rita
26	Esteban Diaz	Schnauzer	Macho	8 años	6.500 kg	Porfirio	E. canis	Carmen Roman
27	Jose Marquez	Dalmata	Hembra	6 años	28 kg	Deisy	Dirofilaria	Las Julietas
28	Julio Carmona	Labrador	Macho	8 años	32 kg	Toby	Dirofilaria	Col. Abastos
29	Adrian Martinez	Bull Terrier	Macho	6 años	26 kg	Killer	E. canis	Col. La Amistad
30	Josefina Luna	Criollo	Hembra	5 años	32 kg	Lulu	E. canis	Santa Fe
31	Julio Cesar Sosa Rivera	San Bernardo	Macho	2 años	48 kg	Bruno	Negativo	Jardines Las Etnias
32	Maria Esther Rivas	Poodle	Macho	3 años	4 kg	Peluche	E. canis	Fco. Villa
33	Guillermo Duarte	Boxer	Macho	4 años	31kg	Leal	E. canis	Jacarandas
34	Coral Diaz	Criollo	Hembra	7 años	33 kg	Muñeca	E. canis y Dirofilaria	Residencial la Hacienda
35	Blanca Ortiz	Criollo	Hembra	8 años	27 kg	Loba	E. canis	San Felipe
36	Jaime Rodriguez	Criollo	Macho	6 años	3 kg	Chikitin	E. canis	Col. Moctezuma

37	Laura Santalise	Schnauzer	Macho	5 años	7 kg	Memo	E. canis	San Marcos
38	Carina Beltran	Pastor Blanco	Macho	9 años	34 kg	Lobo	E. canis	Gomez Palacio
39	Dulce Sierra	Poodle	Hembra	7 años	5 kg	Teky	E. canis	La Union
40	Maribel Morales	Bull Terrier	Macho	6 años	18 kg	Chato	E. canis	La Union
41	Diego Oliveras	Bull Terrier	Hembra	8 años	28 kg	Niky	E. canis	Villa Florida
42	Liliana Garcia	Poodle	Hembra	6 años	12 kg	Dory	E. canis	Col. Nazas
43	Teresa Gutierrez	Poodle	Hembra	4 años	9 kg	Frida	E. canis	Nueva California
44	Cintia Andrade	Labrador	Macho	3 años	35 kg	Boger	E. canis	La Merced
45	Ilse Peña	Criollo	Hembra	4 años	5.500kg	Salchi	E. canis	Valle Dorado
46	Virginia Villegas	Criollo	Macho	5 años	23 kg	Lobo	E. canis	Ejido La Popular Dgo.
47	Jorge Escutia	Bulldog	Hembra	6 años	27 kg	Chata	Dirofilaria	Col. Seccion 38
48	Jorge Escutia	Pastor Aleman	Hembra	9 años	32 kg	Mimy	E. canis	Col. Seccion 38
49	Jose Eduardo Garay	Shar Pei	Hembra	14 años	26 kg	Negra	E. canis	Col. Lazaro Cardenas
50	Maria Cristina De la O	Labrador	Macho	5 años	29 kg	Rufles	E. canis	Col. Valle Verde

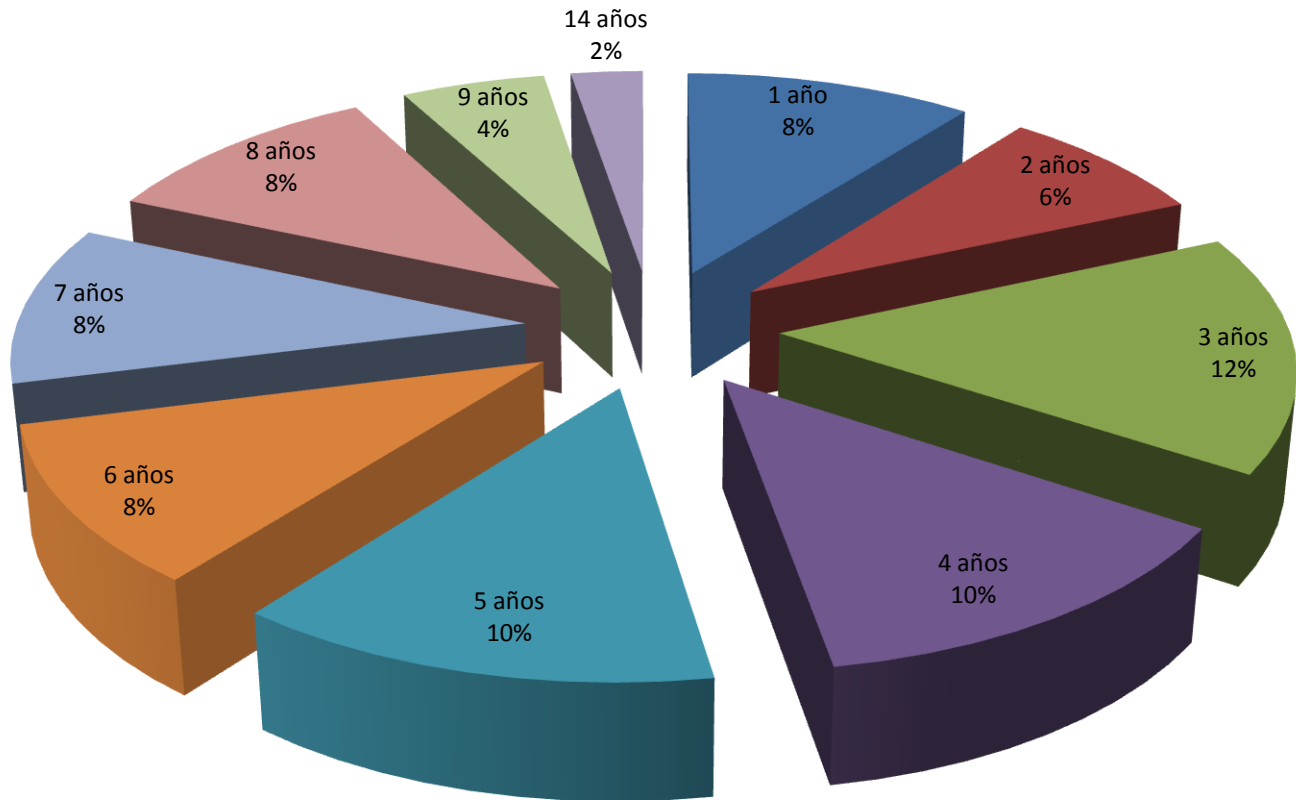
Tabla 1. Muestra los 50 perros sospechosos a E. canis de los cuales se tomo una muestra de sangre completa y se ordenaron de la siguiente forma; por nombre del dueño, raza, sexo, edad, peso, nombre del perro, resultado SNAP 4DX y su localidad.

Grafica 1



Grafica 1. Muestra el número de casos positivos y negativos a E. coli en general

Grafica 2



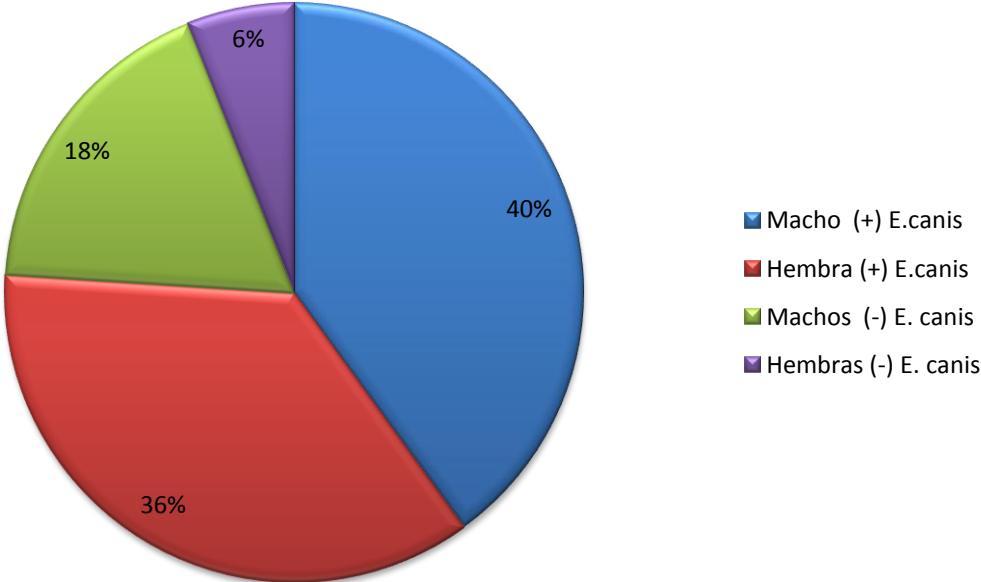
EDAD	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años	6 años	7 años	8 años	9 años	14 años
PERROS +	4	3	6	5	5	4	4	4	2	1
%	8%	6%	12%	10%	10%	8%	8%	8%	4%	2%

Grafica 2. Muestra el número de perros positivos por edad; (76%) en total.

	NOMBRE	RAZA	SEXO	SNAP 4DX POSITIVO
1	Oso	Pastor Aleman	Macho	E. canis
2	Sami	Pastor Aleman	Hembra	E. canis
3	Boby	Pastor Aleman	Macho	E. canis
4	Max	Pastor Aleman	Macho	E. canis
5	Niurka	Criollo	Hembra	E. canis
6	Canela	Criollo	Hembra	E. canis
7	Peluso	Criollo	Macho	E. canis
8	Body	Criollo	Macho	E. canis
9	Lulu	Criollo	Hembra	E. canis
10	Loba	Criollo	Hembra	E. canis
11	Chikitin	Criollo	Macho	E. canis
12	Salchi	Criollo	Hembra	E. canis
13	Lobo	Criollo	Macho	E. canis
14	Negro	Rottweiler	Macho	E. canis
15	Negra	Labrador	Hembra	E. canis
16	Boger	Labrador	Macho	E. canis
17	Rufles	Labrador	Macho	E. canis
18	Negro	Bull Terrier	Macho	E. canis
19	Killer	Bull Terrier	Macho	E. canis
20	Chato	Bull Terrier	Macho	E. canis
21	Niky	Bull Terrier	Hembra	E. canis
22	Ambar	Poodle	Hembra	E. canis
23	Naomy	Poodle	Hembra	E. canis
24	Mimy	Poodle	Hembra	E. canis
25	Peluche	Poodle	Macho	E. canis
26	Teky	Poodle	Hembra	E. canis
27	Dory	Poodle	Hembra	E. canis
28	Frida	Poodle	Hembra	E. canis
29	Porfirio	Schnauzer	Macho	E. canis
30	Memo	Schnauzer	Macho	E. canis
31	Leal	Boxer	Macho	E. canis
32	Lobo	Pastor Blanco	Macho	E. canis
33	Mimy	Pastor Aleman	Hembra	E. canis
34	Negra	Shar Pei	Hembra	E. canis
35	Spock	Pastor Belga	Macho	E. canis
36	Lany	Cocker	Hembra	E. canis y Dirofilaria
37	Oso	Pastor Aleman	Macho	E. canis y Dirofilaria
38	Muñeca	Criollo	Hembra	E. canis y Dirofilaria

Tabla 2. Muestra los Perros positivo; Ehrlichia canis y antígeno de Dirofilaria immitis.

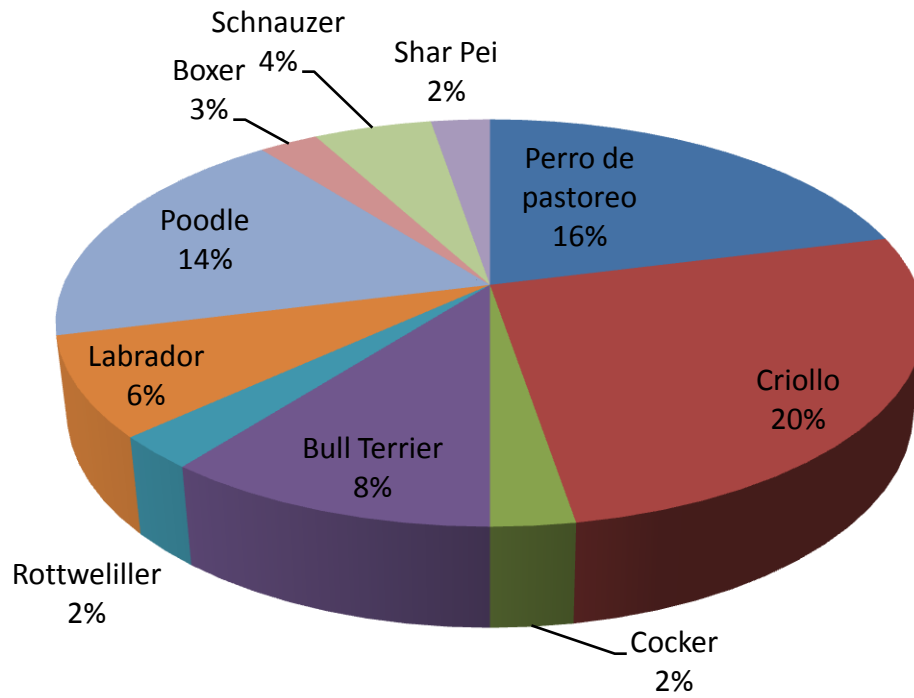
Grafica 3



Sexo	Macho	Hembra
E.coli positive	20	18
E.coli negative	9	3

Grafica 3. Muestra el número de perros por sexo y porcentaje que son positivos y negativos a E.coli.

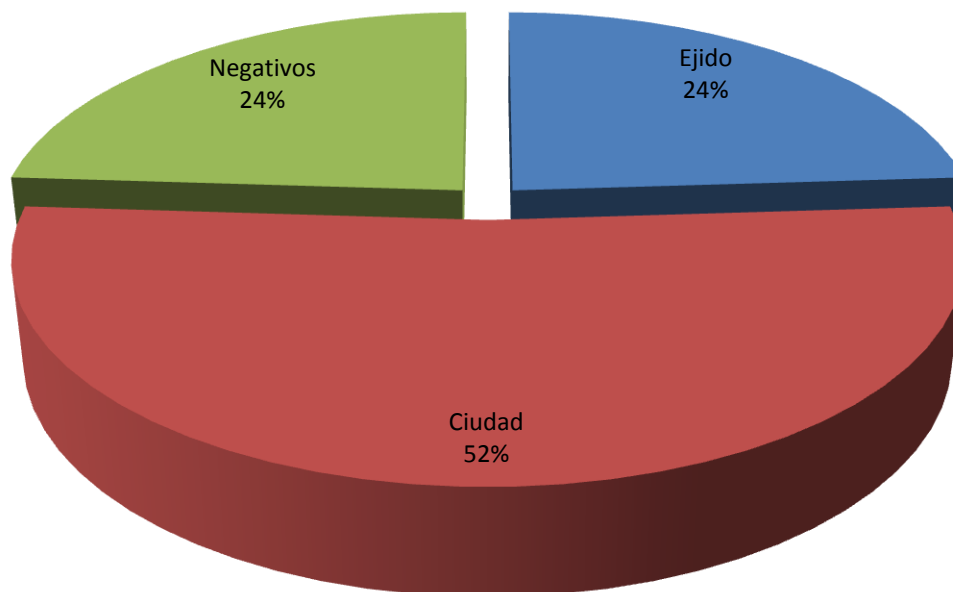
Grafica 4



Grafica 4. Muestra el porcentaje por raza que son positivos a E. canis

Raza	Perro de pastoreo	Criollo	Cocker	Bull Terrie	Rottweiler	Labrador	Poodle	Boxer	Schnauzer	Shar Pei
Positivos	8	10	1	4	1	3	7	1	2	1
Porcentaje %	16%	20%	2%	8%	2%	6%	14%	2%	4%	2%

Grafica 5



	Positivos	Porcentaje
Ejido	12	24%
Ciudad	26	52%
Negativos	12	24%

Grafica 5. Muestra el porcentaje de la Ciudad y Ejido que son positivos a E. canis y Negativo global.

XX. TABLA DE SIGNOS

Num. perros	Epistaxis	Anorexia	Problemas Respiratorios	Problemas Digestivos	Petequias	Sistema Nervioso	Acitis
1	x	x			x		
2		x					
3							
4	x	x					
5		x					x
6	X	x					
7		x					
8	X	x		x			
9		x					
10		x					
11	X			x			
12	X	x					
13		x					
14							
15							
16		x		x			
17		x					
18		x					
19	X	x		x			
20		x	X				x
21		x					
22		x					
23	X	x					
24		x		x			
25		x					
26	X						
27	S		X				
28			x				
29	x			x			
30		x					
31		x					
32	x	x					
33		x					
34		x					x

35		x					
36	x	x				x	
37	x						
38		x					
39		x					
40	x	x					
41		x					
42		x					
43	x	x					
44		x		x			
45	x	x				x	
46		x					
47		x	X				
48	x	x		x			
49		x					
50		x					

Tabla 8. Muestra los principales signos de los 50 perros que se utilizaron para el estudio.

XXI. DISCUSIONES

De acuerdo a Sainz y col. (2000), el cuadro clínico que mayormente se encuentra es fiebre pero es bastante inespecífico, así como pérdida de peso, apatía y anorexia, 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; la epistaxis es la más común. 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 Masson 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 de cadena de la polimerasa (PCR) resultaron negativos. En este estudio los resultados difiere 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 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 La Comarca Lagunera, Coahuila y Durango; México, arroja datos similares al encontrado por Romano en 1998 en Baja California; México, siendo de un 70%; que es un indicador altamente considerable dentro de la región donde se realizó el estudio.

También podemos concluir que la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* está altamente distribuida en La Comarca Lagunera y es un factor importante en la vigilancia de la salud pública ya que esto es índice de una alta Mortalidad entre los canes que no son detectados a tiempo, hay que persistir en fumigaciones seguidas en los lugares donde la

XXII. CONCLUSIONE

Se trabajaron 50 perros con la prueba snap 4dx para diagnosticar la enfermedad *Ehrlichia canis* que el 76% salió positivo que fueron 38 perros y negativos 24% que fueron 12 perros. de los cuales fue variable la raza, el sexo y localidad

El trabajo realizado de *Ehrlichia canis*, en la comarca lagunera es importante el monitoreo cada cierto tiempo para prevenir la zoonosis que es un problema de salud publica importante, por ser una enfermedad fatal tanto como a personas como a los animales y un control mas frecuente en garrapatisidas en tanto en colonias y ejidos.

XXIII. 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):1153-115.
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, Harauf 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. 12ª 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. Recentes 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.