UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE CAMPECHE, CAMPECHE; MÉXICO"

POR:

JORGE AARÓN AKÉ MARTÍNEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO **JUNIO DEL 2007**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE CAMPECHE, CAMPECHE; MÉXICO"

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTADA POR:
JORGE AARÓN AKÉ MARTÍNEZ

ASESOR:
M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COLABORADOR:
M.V.Z. SILVESTRE MORENO ÁVALOS

COLABORADOR:
M.V.Z. JOSE LUIS COVARRUBIAS

COLABORADOR:
M.V.Z. JESUS ALBERTO MESTAS SÁNCHEZ

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO **JUNIO DEL 2007**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE CAMPECHE, CAMPECHE; MÉXICO”

TESIS

APROBADO POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO

_____

M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

_____

M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“DIAGNÓSTICO DE *Ehrlichia canis* POR LA TÉCNICA INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN CANINOS DE LA CIUDAD DE CAMPECHE, CAMPECHE; MÉXICO”

_____

M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
PRESIDENTE

_____

M.V.Z. CUAUHTÉMOC FÉLIX ZORRILLA
VOCAL

_____

M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL

_____

M.V.Z. JESÚS ALBERTO MESTAS SÁNCHEZ
VOCAL SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a aquel que me ha dado todo; una oración no bastará, ni el tiempo de toda una vida; es más que palabras, es más que una oración. Quiero vivir agradecido de todo lo que soy, que haya siempre la pasión de amarte con mi vida entera; es más que palabras, es más que una oración. **GRACIAS PAPÁ DIOS**.

A mi **papá JORGE LUÍS AKÉ CHABLÉ**, que con su ejemplo, dedicación, consejos, comprensión y amor, he logrado salir adelante en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por trabajar muy duro y sin descanso para poder darme la oportunidad de realizarme como profesionista. **TE AMO PAPÁ**.

A la mujer que me trajo al mundo, mi **mamá LAURA MARTÍNEZ DE AKÉ**; gracias por sus oraciones, consejos y por el gran amor que me tiene. Es usted la mejor mamá del mundo. **TE AMO MAMAITA**.

A mis tres tesoros (mis hermanas), **VERÓNICA, SARAH Y PRISCILA**, gracias por todo su cariño, comprensión y apoyo a lo largo de mi carrera. Ustedes saben cuanto las **AMO**.

A mi **tío MARIO MARTÍNEZ**, por su amor y por el apoyo económico que me brindo a lo largo de mi carrera. **LO AMO TÍO**.

A la familia **FÉLIX RÍOS**, por abrirme las puertas de su casa y hogar cuando más lo necesitaba, gracias por brindarme de su confianza. Don **TRINI**, doña **HORTENSIA**, **EDITHES**, nunca los voy a olvidar.

A mi **ALMA TERRA MATER**, por formar profesionales año con año; entre ellos me encuentro ahora yo.

Al **M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ**, por ser mi asesor principal y por su ayuda para poder realizar esta tesis. **MUCHAS GRACIAS**

Al **M.V.Z. SALVADOR RANGEL CASTRO**, por su apoyo desde que comencé la carrera, por su amistad, por darme la oportunidad de trabajar en su clínica. Estoy agradecido por toda su enseñanza hacia mí y por su confianza. En realidad he aprendido mucho de usted. **MUCHAS GRACIAS**.

A la familia **GAYTÁN PUCH**, por brindarme su amistad, su amor y por su apoyo para poder tener anillo de graduación. No se escaparon de ser mis padrinos. **DIOS LES BENDIGA.**

A la familia **NAVA DE LA TORRE,** gracias por sus consejos, por su amistad, por su apoyo y por preocuparse por mí. Nunca los olvidare. **DIOS LES BENDIGA**.

A **MIS MAESTROS**, por compartir experiencias en el salón de clases y así poder alcanzar mi formación profesional.

A MIS **COMPAÑEROS** y **AMIGOS**, con los cuales he compartido 5 años de mi vida y he vivido experiencias inolvidables. Nunca los voy a olvidar.

DEDICATORIA

A DIOS:

Por permitirme y darme la bendición de terminar mi carrera, por estar conmigo siempre que lo he necesitado, en los momentos difíciles pero también en los momentos gratos. Gracias por todo papá DIOS.

A MIS PADRES:

Por ser siempre mi ejemplo de fortaleza, tenacidad y fuerza para salir adelante. Gracias doy a Dios por haberme dado a unos padres como ustedes, me dio a los mejores papás del mundo. Dios los Bendiga. Los AMO con todo mi corazón.

A MIS HERMANAS:

Por siempre apoyarme y siempre estar conmigo, gracias por todo. Siempre contarán conmigo. Las AMO.

INDICE

I. RESUMEN…….. 10
II. INTRODUCCIÓN…….. 11
III. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA…… 13
IV. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUNICIPIO DE CAMPECHE, CAMPECHE; MÉXICO…… 13
4.1. Clima…… 14
4.2. Geografía…… 14
V. ANTECEDENTES…… 14
VI. HISTORIA……... 19
VII. ETIOLOGÍA…… 19
VIII. SINONIMIAS 19
IX. EPIDEMIOLOGÍA…….. 20
9.1. Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*…… 20
X. PATOGENIA…….. 22
XI. SIGNOS…….. 23
11.1. Signos multisistémicos…….. 23
11.2. Signos oculares……... 24
11.3. Signos neurológicos…… 24
11.4. Poliartritis…….. 24
XII. DIAGNÓSTICO…….. 25
12.1. Hematología…… 25
12.2. Bioquímica…… 25
12.3. Frotis…….. 26

12.4. Serología…….. 26
12.5. Inmunoblot y Reacción de Cadena de Polimerasa… 27
12.6. Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA)..... 28
XIII. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL…….. 28
XIV. HISTOPATOLOGÍA…….. 29
XV. TRATAMIENTO……. 30
XVI. PREVENCIÓN…….. 32
XVII. IMPORTANCIA EN LA SALUD PUBLICA……. 33
XVIII. JUSTIFICACIÓN……. 34
XIX. OBJETIVOS…….. 34
19.1. Objetivo general…….. 34
19.2. Objetivo específico…… 34
XX. META…….. 34
XXI. HIPÓTESIS……. 35
XXII. MATERIALES Y MÉTODOS…….. 35
XXIII. RESULTADOS…….. 40
XXIV. DISCUSIONES…….. 46
XXV. LITERATURA CITADA……. 48

I. RESUMEN

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

De las 30 muestras analizadas, 28 fueron positivas, (93.33%) y 2 negativas, (6.66%). Se analizaron las variables como el sexo, la edad y la raza, además de la signología clínica. Los resultados fueron similares al estudio realizado por Romano en 1998, en Baja California; México, en el cual se obtuvo un 93.3% de seroprevalencia de la enfermedad.

II. INTRODUCCIÓN

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

descarta la presencia de la enfermedad, por lo que se deben hacer basándose en una combinación de signos clínicos, anormalidades, exámenes hematológicos y exámenes serológicos para obtener un diagnóstico etiológico definitivo. Se utilizan los siguientes métodos: el PCR, fluorescencia indirecta de anticuerpos, frotis y la técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Existen muchas otras patologías que cursan con trombocitopenia o con sintomatología hemorrágica en la práctica clínica, como por ejemplo, la intoxicación por estrógenos o con warfarina entre las más comunes, pero también cabe señalar otras enfermedades infecciosas como fiebre manchada de las montañas rocosas, babesiosis, moquillo canino, hepatitis infecciosa viral canina, leptospirosis, entre otras. El tratamiento de la ehrlichiosis canina incluye medicamentos antirikettsiales 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 a relacionado en un 99 % a la ehrlichiosis monocítica humana con la *Ehrlichia canis*.

III. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA

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

IV. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUNICIPIO DE CAMPECHE, CAMPECHE; MÉXICO

El municipio de Campeche es uno de los 11 Municipios del Estado de Campeche. En él se encuentra la ciudad de Campeche, capital del Estado. (Fig. 1.).

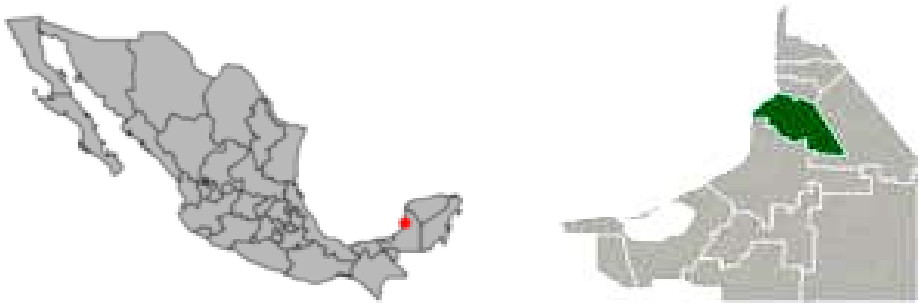

Figura 1. localización del municipio de Campeche, Campeche; México (Wikipedia, la enciclopedia libre.htm)

- Altitud: 1 metro.
- Latitud: 19º 51' 00" N
- Longitud: 090º 31' 59" O

4.1. Clima

La temperatura promedio anual es de 26ºC, presentándose los niveles máximos antes del solsticio de verano con un promedio de 28ºC, alcanzándose una temperatura máxima histórica de 43ºC.

La temporada de lluvias está comprendida entre los meses de Junio a Octubre y la de estiaje (ausencia de lluvias), del mes de Enero a mediados del mes de Mayo.

4.2. Geografía

El Municipio de Campeche limita al Norte con el Municipio de Tenabo; al Este con el Municipio de Hopelchén, al Sur, con el Municipio de Champotón y al Oeste con el Golfo de México. Tiene una extensión territorial de 3,410.64 Km2 que representa el 6.0 % del territorio Estatal. La superficie del municipio es plana con pequeñas ondulaciones no mayores a 100 m. sobre el nivel del mar.

Se ubica en la Gran Plataforma de la Península de Yucatán, compuesta de roca caliza y que se levanta por encima del mar desde hace sesenta millones de años.

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 Boroome, de Mayo de 1997 hasta Agosto de 1999, investigándose la evidencia de infecciones por *Ehrlichia canis*, usando diagnóstico por la técnica de fluorescencia indirecta de anticuerpos. Los resultados fueron, de los 316 exámenes, 7 reaccionaron a la fluorescencia

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

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

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

adicionales que la ehrlichiosis canina monocítica es una enfermedad infectocontagiosa y la signología más frecuente que presentan los pacientes afectados fue epistaxis, pérdida de peso, palidez de mucosas, anorexia y depresión (Romano y col., 1998).

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

Factor		**N^{o}**	**N^{o} casos positivos (%)**
	Total	430	20 (4.7)
Sexo	Macho	232	10 (4.3)
	Hembra	198	10 (5.1)
Edad	0-2	74	3 (4.1)
	2-4	85	6 (7.1)
	4-6	60	4 (6.7)
	6-8	61	3 (4.9)
	8-10	43	1 (2.3)
	10-12	38	2 (5.3)
	12-14	28	0 (0.0)
	14-16	13	0 (0.0)
	Desconocidos	28	1 (3.6)
Raza	Pastor de Shetland	32	0 (0.0)
	Cobrador dorado	28	4 (14.3)
	Beagle	26	4 (15.4)
	Shit-zu	22	0 (0.0)
	Husky	18	1 (5.6)
	Maltes	17	0 (0.0)
	Labrador	12	0 (0.0)
	Pug	10	0 (0.0)
	Yorkshire	10	0 (0.0)
	Pomeranian	7	0 (0.0)
	Dachshund	7	0 (0.0)
	Pointer	6	1 (16.7)
	Akita	31	0 (0.0)
	Shiba-inu	29	1 (3.4)
	Kishu	5	0 (0.0)
	Mongrel	109	7 (6.4)
	Otros	61	2 (3.3)

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

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

- 75 perros sospechosos a *Ehrlichia spp*.
- 122 perros sospechosos a borreliosis.
- 157 perros sospechosos a enfermedades sistemáticas no asociadas con las garrapatas.

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

VI. HISTORIA

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

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

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

VII. ETIOLOGÍA

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

VIII. SINONIMIAS

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

IX. EPIDEMIOLOGÍA

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

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

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

9.1. Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*

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

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

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

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

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

X. PATOGENIA

La infección del huésped vertebrado ocurre cuando una garrapata infectada ingiere sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio en donde se alimenta. El microorganismo también se transmite por transfusiones sanguíneas de donadores infectados. El curso subsecuente de la ehrlichiosis se ha dividido en tres fases: aguda, subclínica y crónica, basándose en los signos clínicos y las anormalidades 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 anímales infectados son competentes eliminaran *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 esplegnomegalia en 20 y 25 % respectivamente. Los signos respiratorios y cardiacos relacionados entre sí, pueden ocurrir debido a hemorragias y como consecuencias de la anemia, que puede llegar a ser grave (Harrus y col., 1998; Russell, 1999; Tiller, 2000; Neer, 2000; Ford 2002).

11.2. Signos oculares

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

11.3. Signos neurológicos

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

11.4. Poliartritis

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

XII. DIAGNÓSTICO

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

12.1. Hematología

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

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

12.2. Bioquímica

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

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

12.3. Frotis

Es posible establecer un diagnostico 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 diagnostico 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 solidó, 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 practica clínica, como por ejemplo, la intoxicación por estrógenos o con warfarina entre las más comunes, pero también cabe señalar otras enfermedades infecciosas como Fiebre manchada de las montañas rocosas, Babesiosis, Moquillo canino, Hepatitis infecciosa viral canina y Leptospirosis junto a las enfermedades inmunológicas como las coagulopatías inmunomediadas y el lupus eritematoso sistémico (Tiller y col., 2000).

XIV. HISTOPATOLOGÍA

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

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

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

Las alteraciones pulmonares en la ehrlichiosis canina son comunes con neumonía intersticial. Al inicio, hay una acumulación subendotelial de células mononucleares y es posible observar hemorragias intersticiales y alveolares.

Puede también encontrarse microorganismos de *Ehrlichia canis* en macrófagos del endotelio vascular pulmonar (Neer, 2000).

En las lesiones renales se incluye una vasculitis con infiltrado de las células plasmáticas localizados en la unión corticomedular, en los perros con ehrlichiosis ocurre glomerulonefritis y plasmasitosis 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 antirikettsiales y los cuidados de apoyo. En general, cuando más temprano se inicia el tratamiento del proceso patológico, más favorables serán los resultados y pronósticos (Neer, 2000).

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

En los perros con enfermedad en la fase aguda y crónica leve suele ocurrir una mejoría clínica en el transcurso de 24-48 hrs. después de iniciada la terapéutica con las tetraciclinas. La cifra de plaquetas comienza a aumentar en forma correspondiente durante este tiempo y por lo general llega a los límites

normales alrededor de 14 días después de la terapéutica. La recuperación no equivale a inmunidad permanente y es posible que los perros se infecten nuevamente con *Ehrlichia canis* después de un tratamiento eficaz (Cuadro 2; Neer, 2000).

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

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

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

Cuadro 2. Terapeutica 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).

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

XVIII. JUSTIFICACIÓN

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

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

XIX. OBJETIVOS

19.1. Objetivo General

Detectar la evidencia de anticuerpos de la rickettsia *Ehrlichia canis* en caninos de la ciudad de Campeche, Campeche; México.

19.2. Objetivo Específico

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

XX. META

Diagnosticar por el método de ELISA a 30 caninos sospechosos de la enfermedad ehrlichiosis canina en la Ciudad de Campeche, Campeche; México.

XXI. HIPÓTESIS

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

XXII. MATERIALES Y MÉTODOS

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

1. Sujetando el envase en forma vertical, añadir 4 gotas de conjugado al tubo para muestra (tapa azul) (Fig.4).

Figura 4

2. Utilizando la pipeta provista, depositar 3 gotas de la muestra (sangre completa, suero o plasma) dentro del tubo para muestras (tapa azul) (Fig. 5).

Figura 5

3. Tapar el tubo de muestra y mezclar completamente invirtiendo el tubo de 3-5 veces.

4. Colocar el dispositivo en una superficie plana, agregar el contenido en su totalidad en el dispositivo (Fig. 6) siendo cautelosos para no derramar el contenido fuera del dispositivo; la muestra correrá a través de la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30-60 segundos (Fig. 7), parte de la muestra puede permanecer en el dispositivo, observar cuidadosamente si aparece muestra o un color azul en el círculo de activación, cuando el color aparezca en el círculo de activación, presionar con firmeza el activador para que la muestra fluya por el cuerpo del dispositivo (Fig. 8).

Nota: algunas muestras pueden no fluir hacia el círculo de activación dentro de los 60 segundos y además, el círculo puede no colorearse; en este caso, se debe presionar el activador después de que la muestra haya fluido a través de la ventana de resultados, se debe mantener el dispositivo en posición horizontal para asegurar resultados precisos.

Figura 6

Figura 7

Figura 8

5. Leer el resultado de la prueba en 8 minutos (Fig. 9).

Figura 9

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

- Interpretación de resultados

Para determinar el resultado de la prueba, leer los puntos de activación en la ventana de resultados (Fig. 10); el desarrollo de color en los puntos de activación es proporcional a la concentración de anticuerpos de *E. canis* y *B. burdorgferi* y de antígeno de gusano del corazón, si el control positivo no desarrolla color se debe repetir la prueba.

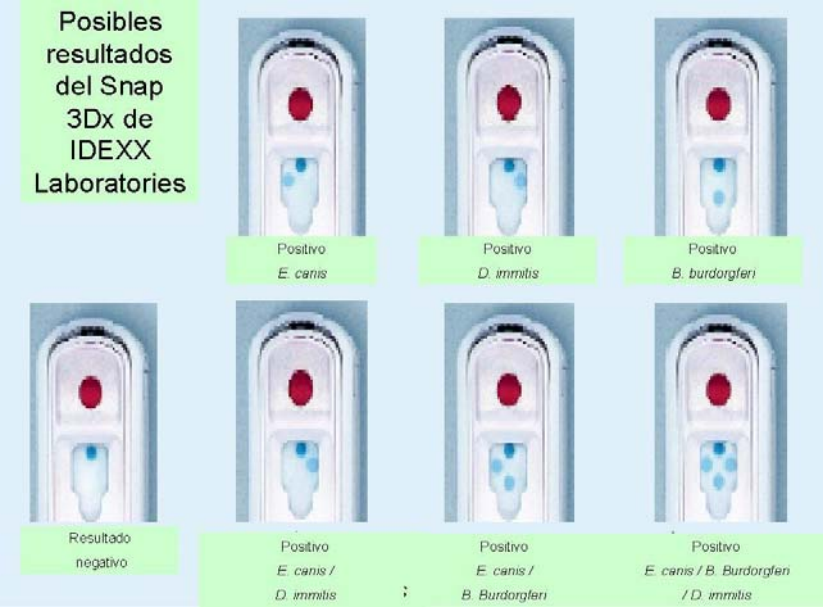

Figura 10

- Resultado negativo: Solo el punto de activación positivo se colorea (Fig.10).

- Resultado positivo.: Anticuerpos *E. canis*: el control positivo y el punto de activación *E. canis* desarrolla coloración (Fig. 11).

Figura 11

- Resultados inválidos.

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

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

XXIII. RESULTADOS

De las 30 muestras de sangre entera proveniente de distintos caninos de la ciudad de Campeche, Campeche; México y que eran sospechosos a la enfermedad de ehrlichiosis canina causada por *Ehrlichia canis*, 28 muestras (93.33%) en total resultaron positivas a antígenos de *Ehrlichia canis*, y 2 negativas (6.66%), lo cual es un número considerable dentro de la población canina. (Cuadro 5 y 6).

FACTOR		**N°**	**N° DE CASOS POSITIVOS (%)**
	Total	30	28 (93.33)
Sexo	Macho	21	20 (95.23)
	Hembra	9	8 (88.88)
Edad (años)	0-2	14	12 (85.71)
	3-5	13	13 (100)
	6-8	2	2 (100)
	9-11	1	1 (100)

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

RAZA	SEXO	Nº	EDAD EN AÑOS	Presencia de garrapatas al momento de la prueba	Nº de casos positivos (%)
Rottweiler	M H	2 -	3-5 -	SI -	2 (100) -
*Maltes (tipo)	M H	4 2	1-2 1-6	SI SI	4 (100) 2 (100)
Criollo	M H	3 -	1-3 -	SI -	3 (100) -
Dálmata	M H	2 -	4-5 -	SI -	2 (100) -
Pequines	M H	2 -	3 -	SI -	2 (100) -
Poodle	M H	1 -	1 -	SI -	1 (100) -
Pit Bull	M H	1 2	4 1	SI SI	1 (100) 2 (100)
Cocker	M H	1 2	2 5	SI SI	1 (100) 2 (100)
Boxer	M H	3 1	2-3 1	SI SI	3 (100) 1 (100)
Chihuahueño	M H	- 1	- 7	- SI	- 1 (100)
Afgano	M H	1 -	11 -	SI -	1 (100) -
Dachshund	M H	- 1	- 3	- NO	- 0 (0.0)
Pug	M H	1 -	1 -	SI -	0 (0.0) -

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

- *Cruzas de esta raza
- M-macho H-hembra

De acuerdo con la hipótesis planteada, queda demostrado que de las muestras colectadas, el 93.33% sobrepasa el 50% planteado en la hipótesis.

#	RAZA	SNAP	NOMBRE	SEXO	EDAD	PESO EN KG	OBSERVACIONES
1	ROTTWEILER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	NICK	MACHO	3 AÑOS	27	Epistaxis – anorexia – petequias abdominales – temperatura 38.6 °C – *
2	MALTES (TIPO)	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	ROCKY	MACHO	2 AÑOS	8	Hematomas en todo el cuerpo – anorexia – temperatura 38.8 °C – *
3	CRIOLLO	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	CHIQUILIN	MACHO	3 AÑOS	12	Epistaxis – petequias abdominales – hematuria – anorexia – temperatura 39.4 °C – *
4	MALTES (TIPO)	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	PASHMINA	HEMBRA	6 AÑOS	15	Parálisis tren posterior – ***eccema*** cutáneo general – anorexia – debilidad – temperatura 38.6 °C – **
5	MALTES (TIPO)	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	MUÑECA	HEMBRA	1 AÑO	5	Hematomas abdominales – laringotraqueitis – temperatura 38.7 °C – *
6	MALTES (TIPO)	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	LUCHIANO	MACHO	2 AÑOS	8	Convulsiones – debilidad tren posterior – temperatura 38.5 °C – *
7	CRIOLLO	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	WILLY	MACHO	1 AÑO	7	Debilidad – anemia – temperatura 38.6 °C – ***
8	DALMATA	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	ROCKE	MACHO	5 AÑOS	15	Anemia – hematomas abdominales – debilidad – anorexia – dificultad para caminar- conjuntivitis – temperatura 38.8 °C – *
9	MALTES (TIPO)	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	CLIFORTH	MACHO	2 AÑOS	9	Hematomas abdominales – conjuntivitis – laringotraqueitis – epistaxis – temperatura 38.7 °C – *
10	MALTES (TIPO)	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	NIÑO	MACHO	1 AÑO	4.5	Parálisis tren posterior – anorexia – petequias abdominales – temperatura 39.4 °C – ***

- Todos presentaron inflamación de ganglios submaxilares
- Presencia de GARRAPATAS: *LEVE – **MODERADO – ***ABUNDANTE
- a)-EHRLICHIA b)- DIROFILARIA c)-LYME **([+]POSITIVO [-]NEGATIVO)**

#	RAZA	SNAP	NOMBRE	SEXO	EDAD	PESO EN KG	OBSERVACIONES
11	PEQUINES	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	LASSY	MACHO	3 AÑOS	3.5	Parálisis tren posterior – anorexia – petequias abdominales – temperatura 38.6 °C – *
12	POODLE	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	LUKA	MACHO	1 AÑO	4	Parálisis – anemia – petequias abdominales – anorexia – temperatura 39.3 °C – **
13	PIT BULL	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	SUSUKY	HEMBRA	8 MESES	11	Melena – petequias – anorexia – laringitis – temperatura 38.8 °C – ***
14	PIT BULL	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	AKASHA	HEMBRA	1 AÑO	18	Hematomas abdominales – anorexia – conjuntivitis – temperatura 39.4 °C – *
15	CRIOLLO	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	ZEUS	MACHO	2 AÑOS	12	Epistaxis – depresión – anorexia – temperatura 39.4 °C – **
16	DALMATA	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	KEVIN	MACHO	4 AÑOS	17	Ascitis – anemia – depresión – debilidad tren posterior – dificultad para orinar – temperatura 39.3 °C – *
17	COCKER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	JUNIOR	MACHO	2 AÑOS	8	Convulsiones – epistaxis – perdida de apetito – conjuntivitis – temperatura 38.6 °C – **
18	PEQUINES	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	HIDEKY	MACHO	3 AÑOS	3	Parálisis tren posterior – anorexia – depresión – anemia – **secuelas de parálisis C.I.** – temperatura 39.2 °C – *
19	BOXER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	ANAKIM	MACHO	3 AÑOS	22	Parálisis tren posterior – anemia – depresión – temperatura 38.7 °C – *
20	COCKER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	SANNY	HEMBRA	5 AÑOS	7	Convulsiones – pérdida de peso – anorexia – temperatura 38.6 °C – *

- Todos presentaron inflamación de ganglios submaxilares
- Presencia de GARRAPATAS: *LEVE – **MODERADO – ***ABUNDANTE
- a)-EHRLICHIA b)- DIROFILARIA c)-LYME **([+]POSITIVO [-]NEGATIVO)**

#	RAZA	SNAP	NOMBRE	SEXO	EDAD	PESO EN KG	OBSERVACIONES
21	PIT BULL	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	GUFFY	MACHO	4 AÑOS	13	Parálisis – anorexia – petequias abdominales – depresión – temperatura 38.6 °C – ***
22	COCKER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	KOKIS	HEMBRA	5 AÑOS	15 (obesa)	Parálisis tren posterior – melena – depresión – con mucho apetito – temperatura 38.8 °C – *
23	CHIHUAHUEÑO	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	FRIDA	HEMBRA	7 AÑOS	3	Melena – parálisis tren posterior – anorexia – anemia – temperatura 38.7 °C – *
24	BOXER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	OLIVER	MACHO	3 AÑOS	20	Epistaxis – petequias y hematomas abdominales – conjuntivitis – anorexia – temperatura 38.6 °C – **
25	BOXER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	NENA	HEMBRA	3 MESES	3	Parálisis tren posterior – melena – anorexia – depresión – conjuntivitis – laringitis – temperatura 39.4 °C – *
26	ROTTWEILER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	TEQUILA	MACHO	5 AÑOS	25	Epistaxis – anemia – anorexia – dermatitis – temperatura 38.7 °C – ***
27	AFGANO	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	EURIKO	MACHO	11 AÑOS	19	Parálisis tren posterior – anemia – hematomas y petequias abdominales – anorexia – temperatura 38.6 °C – *
28	BOXER	a) **[+]** b) **[-]** c) **[-]**	NIÑO	MACHO	2 AÑOS	18	Hematuria – depresión – debilidad – temperatura 38.6 °C – ***
29	DACHSHUND	a) **[-]** b) **[+]** c) **[-]**	NENA	HEMBRA	3 AÑOS	6	Parálisis tren posterior – anemia – taquicardia – disnea – temperatura 38.8 °C
30	PUG	a) **[-]** b) **[+]** c) **[-]**	MAX	MACHO	9 MESES	7	Dificultad para caminar – melena – temperatura 38.7 °C – *

- Todos presentaron inflamación de ganglios submaxilares
- Presencia de GARRAPATAS: *LEVE – **MODERADO – ***ABUNDANTE
- a)-EHRLICHIA b)- DIROFILARIA c)-LYME **([+]POSITIVO [-]NEGATIVO)**

#	EPISTAXIS	ANOREXIA	PETEQUIAS	Temperatura normal	HEMATOMAS	HEMATURIA	Temperatura elevada	Parálisis tren posterior	MELENA	ECCEMA	DEBILIDAD	LARINGOTRAQUEITIS	CONVULSIONES	ANEMIA	ASCITIS	DEPRESION	TAQUICARDIA	DISNEA	CONJUNTIVITIS
1	+	+	+	+															
2		+		+	+														
3	+	+	+			+	+												
4		+		+				+		+	+								
5				+	+							+							
6				+				+					+						
7				+							+			+					
8		+		+	+			+			+			+					+
9	+			+	+							+							+
10		+	+				+	+											
11		+	+	+				+											
12		+	+				+	+						+					
13		+	+	+					+										
14		+			+		+												+
15	+						+									+			
16							+	+						+	+	+			
17	+			+									+						+
18		+					+	+						+		+			
19				+				+						+		+			
20		+		+									+						
21		+	+	+				+								+			
22				+				+	+							+			
23		+		+				+	+					+					
24	+	+	+	+	+														+
25		+					+	+	+			+				+			+
26	+	+		+						+				+					
27		+	+	+		+		+						+					
28				+		+					+					+			
29				+				+						+					
30				+				+	+								+	+	

XXIV. DISCUSIONES

De acuerdo a Sainz y col. (2000), el cuadro clínico que mayormente se encuentra es fiebre pero es bastante inespecífico, así como perdida 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, perdida 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 Campeche, Campeche; México, arroja datos similares al encontrado por Romano en 1998 en Baja California; México, siendo de un 93.33%; 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 el estado de Campeche, Campeche; México y es un factor importante en la vigilancia de la salud pública.

XXV. 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 gammophathy 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 Trick-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 detención 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 norhern Australia. Aust Vet J. 79(8):559-562.

20. Max J, Breitschwerdt B, Chomel B, Eschner A, and Neer T, 1999. Routable on tcks and Tick transmitted diseases. Vet Forum. 16(4):38-45.

21. Mc Brid J, Corstvet R, Breitschwerdt E, and Walker D, 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with Recombinant Proteins. J Clin Microbiol. 39(1):315-322.

22. Neer T, 2000. Ehrlichiosis monocítica y granulocítica canina en enfermedades infecciosas en perros y gatos. Green C, and Harvey J, 2ª Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana México. Cap. 28. p.153-162.

23. Ohashi N, Unver A, Zhi N, and Rikihisa Y, 1998. Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia canis* and Application of the Recombinant Protein for Serodiagnosis. J Clin Microbiol. 36(9):2671-2680.

24. Plum D, 1999. Drug hand book. 3rd ed. Edit. Saunders Company USA. p. 229-231.

25. Pusterla N, Pusterla J, Deplazes P, Wolfensberger C, Muller W, Horauf A, Reusch C, and Lutz H, 1998. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. J Clin Microbiol. 36(12):3460-3465.

26. Romano O, Tinoco G, Covarrubias P, 1998. Demostración de *Ehrlichia canis* mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, Baja California. AMMVEPE. 9(3):86.

27. Russel T, 1997. Ehrlichiosis canina: implicaciones clínicas de factores humorales, en Terapéutica veterinaria de pequeños animales. Kirk R, y Bonagura J. 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.