



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

**“CAMBIOS HEMATOLOGICOS EN PACIENTES POSITIVOS A
EHRlichiosis CANINA EN LA CIUDAD DE LÁZARO CÁRDENAS
MICHOACÁN”**

TESIS QUE PRESENTA:

PMVZ. Víctor Hugo Romero Blancas

PARA OBTENER EL TITULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR: MC. SALVADOR PADILLA ARELLANES

CO-ASESOR: M.E. NORMA LETICIA A. ALVARADO ENRÍQUEZ

Morelia Michoacán, Noviembre del 2011.

CAMBIOS HEMATOLOGICOS EN PACIENTES POSITIVOS A EHRlichiosis CANINA EN LA CIUDAD DE LÁZARO CÁRDENAS MICHOACÁN

RESUMEN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad producida por una bacteria intracelular gramnegativa cocoide pleomórfica la cual se presenta en forma intracitoplásmica en grupos de organismos llamados mórulas, este agente infecta a los monocitos de los perros y es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* la cual no es considerada como reservorio. El objetivo de este trabajo fue obtener la prevalencia general de perros que presentaran anticuerpos contra *E.canis* (positivos a la prueba de ELISA) en la ciudad de Lázaro Cárdenas, así como identificar las alteraciones hematológicas más frecuentes de dichos pacientes para describir los cambios hematológicos durante la fase subclínica de la enfermedad. Los perros muestreados no deberían presentar signos clínicos de la enfermedad, además deberían tener historial infestación reciente del vector y no debieron ser tratados con antibióticos por los menos en el último mes. Se observó que el 64% de los perros muestreados presentaron títulos positivos a la enfermedad, y que el 100% de los perros positivos presentó una o más alteraciones en el hemograma. Se identificó que ningún paciente presentó pancitopenia y solo un bajo porcentaje presentó bicitopenias, además se identificó que la alteración más frecuente fue la hiperproteinemia y leucocitosis por linfocitosis en su mayoría. Se pudo concluir que la prevalencia en zonas donde existe el vector es muy alta y que hay una gran cantidad de perros que no presentan signología clínica de la enfermedad por lo que dicho estudio proporciona una guía práctica para interpretar alteraciones hematológicas si en la historia clínica hay historial de infestación por el vector.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.2 PATOGÉNESIS	3
1.3 HALLAZGOS CLÍNICOS	7
1.4 DIAGNÓSTICO	10
1.5 TRATAMIENTO	21
1.6 PREVENCIÓN.....	26
1.7 CONSIDERACIONES DE SALUD PÚBLICA.....	27
2. OBJETIVOS	29
3. HIPÓTESIS	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	41

1. INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis canina también es conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi y pancitopenia tropical canina.

1.1 ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Los microorganismos del género *Ehrlichia* son considerados como parásitos intracelulares obligados los cuales producen ehrlichiosis monocítica canina. Esta pequeña bacteria gramnegativa cocoide pleomórfica se presenta en forma intracitoplásmica en grupos de organismos llamados mórulas. (Dumler, 2001) Se han identificado tres miembros del grupo; *E.canis*, *E.chaffensis* y *E.ruminantium* las cuales infectan a los monocitos de los perros.

E.canis

Dantien y Lestoquard identificaron *E.canis* por primera vez en 1935. (Donatein, et al. 1937) La ehrlichiosis monocitotrópica canina (EMC) llamó mucho la atención cuando cientos de perros militares estadounidenses, muchos Pastores alemanes, murieron de la enfermedad durante la guerra de Vietnam. *E.canis* llamó aún más la atención a fines de la década de 1980, cuando se sospechó de forma errónea que la rickettsia había infectado a seres humanos. Sin embargo en 1991, se encontró que una especie nueva del género *Ehrlichia*, *E.chaffensis*, provocaba ehrlichiosis monocitotrópica humana.

E.canis presenta una distribución mundial (Asia, África, Europa y América). A pesar de la presencia de vectores adecuados parece que las áreas oceánicas o insulares que mantuvieron cuarentena, como Australia y reino unido, no presentan infección por *E.canis*(Jittapalapong, et al.1993; Martin, et al. 2000).

En un estudio publicado en México (Núñez, 2003) se reportó la prevalencia de *E.canis* en dicho país, donde se observó que un 33.1% de los perros muestreados (n=2,395) resultaron positivos por prueba serológica de ELISA. Observándose en la región de Michoacán una prevalencia nula a partir de 13 perros muestreados. Aunque el autor señala que los resultados obtenidos en distintas regiones del país podían variar ampliamente debido a la diversidad de ecosistemas y de los factores de riesgo a los que se exponen los animales tales como el vector de la enfermedad.

El primer caso se ha informado solo recientemente en un perro importado de Japón.(Sumner, et al.1997) No obstante ello, en un estudio epidemiológico reciente de garrapatas tomadas de perros en Japón, no se encontraron resultados positivos a reacción en cadena de polimerasa (PCR) de *E.canis* en 1211 garrapatas examinadas. (Inokuma, et al. 2003) Los huéspedes vertebrados de *E.canis* incluyen miembros de la familia Cánidos. Se considera que el zorro, el perro y el chacal, además del perro doméstico, son huéspedes reservorio. Existe información nueva que sugiere que *E.canis* o un organismo estrechamente relacionado puede infectar a gatos. El vector artrópodo de *E.canis* es la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*. Esta garrapata de un huésped prefiere alimentarse de perros en las tres etapas del ciclo vital, también se transmitió infección por *Dermacentor variabilis*, la garrapata americana del perro.(Johnson, et al. 1998)

El modo de transmisión es transestadial. Como no ocurre propagación transovárica, el vector garrapata, no puede ser reservorio verdadero. Las garrapatas adquieren *E.canis* como larvas o ninfas al alimentarse de perros con rickettsias. Transmiten la infección a perros susceptibles durante por lo menos 155 días después de la infección. (Groves, et al. 1975) Esto permite al patógeno sobrevivir al invierno en las garrapatas y luego en la primavera siguiente permite a la garrapata infestar e infectar a perros susceptibles. La mayoría de los casos de ehrlichiosis monocitotrópica canina (EMC) ocurren durante la temporada cálida, cuando abundan los vectores garrapata; sin embargo, a diferencia de otras rickettsias que dependen de vectores de exterior, la enfermedad inducida por *E.canis* presenta una distribución más pareja en cuanto estaciones.

Esto puede ser resultado también del prolongado periodo subclínico en animales infectados en forma crónica. Todavía no se determinó el tiempo necesario para que la garrapata que se adhiere transmita infección por *E.canis*, como se conoce en otras enfermedades provocadas por garrapatas. (Kidd, et al. 2003) Los perros que viven en regiones endémicas o viajan por ellas pueden sufrir esta enfermedad.

1.2 PATOGÉNESIS

Una gran variedad de factores, incluso el tamaño del inóculo de *E.canis*, pueden influir en el curso y el resultado de la infección. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del organismo. Un análisis de inmunotransferencia de respuesta de IgG a *E.canis* ha mostrado que puede existir diversidad antigénica entre organismos de *E.canis* de distintas partes del mundo y ha sugerido que este hecho puede afectar la gravedad de la enfermedad. (Neer, 1995) La enfermedad concomitante con otros parásitos transmitidos por garrapatas u otros patógenos puede afectar también la gravedad y las manifestaciones de la enfermedad. Es posible que los animales inmunodeficientes desarrollen manifestaciones más graves y es más probable que muestren gran cantidad de mórulas circulantes. No existe predilección de edad ni sexo en EMC; sin embargo, parece que los Pastores alemanes son más susceptibles que otras razas. Es más, la enfermedad en esta raza es más grave y presenta un pronóstico más débil que en otras. Puede atribuirse a la variación de susceptibilidad de la raza a diferencias raciales en la habilidad para desarrollar respuestas inmunes humorales o celulares adecuadas, o ambas. Se observa depresión de la respuesta inmune celular a la infección por *E.canis* en Pastores alemanes comparados con Beagle, mientras que no se registraron diferencias significativas en la respuesta inmune humoral entre las dos razas. (Nyindo, et al. 1991)

Ocurre infección natural de huésped vertebrado cuando una garrapata infectada ingiere sangre y secreciones salivales contaminan el sitio de alimentación. Puede

haber propagación iatrogénica con transfusiones de sangre de donantes infectados. Durante el periodo de incubación de 8 a 20 días, los organismos se multiplican en macrófagos y sistema fagocítico mononuclear, mediante fisión binaria y se propagan por todo el cuerpo. El curso de ehrlichiosis posterior se ha dividido en tres fases – aguda, subclínica y crónica- sobre la base de los signos clínicos y anomalías clinicopatológicas después de la inoculación experimental. Sin embargo, con infección producida de forma natural, resulta la estadificación exacta de la enfermedad. La fase aguda dura entre 2 a 4 semanas, durante las cuales puede observarse signos como fiebre, descarga oculonasal, anorexia y depresión, petequias, equimosis, linfadenomegalia y esplenomegalia. Las anomalías típicas de laboratorio en esta fase incluyen trombocitopenia, y leucopenia y anemias leves. La mayoría de los perros se recupera de la enfermedad aguda con tratamiento adecuado. Es posible que los perros no tratados y los tratados en forma inapropiada ingresen en la fase subclínica. Durante esta fase, el perro se normaliza y la pirexia se resuelve. Desde el punto de vista clínico, los animales se ven saludables; sin embargo es posible que los recuentos de plaquetas permanezcan en niveles inferiores a los rangos de referencia.(Waner, et al. 1999; Waner et al. 1996) Los perros que se encuentren dentro de la fase subclínica pueden ser portadores persistentes en potencia durante años, como lo describió un estudio de seguimiento de 3 años.(Harrus, et al. 1998) Los resultados de infecciones experimentales indican que es más probable que el bazo aloje organismos de *E.canis* durante la fase subclínica de EMC y que sea el último órgano antes de eliminarlo. Se cree que el bazo cumple un papel importante en la patogénesis y la expresión de la enfermedad. Los perros a los que se les realizó esplenectomía y fueron infectados de forma experimental con *E.canis* mostraron enfermedad clínica leve en comparación con perros sin esplenectomía.(Harrus, et al. 1998) Durante el curso de la infección, ocurren recombinaciones repetidas en los genes antigénicos proteicos principales de la membrana externa de ehrlichias, lo que conduce a la generación de variaciones en epítopes inmunogénicos. (Ravyn, et al. 1999) De esta manera, es posible que los organismos evadan los mecanismos de defensa del huésped y den como resultado infecciones persistentes. Es posible que los perros inmunocompetentes eliminen

rickettsias; de otro modo, es probable que sigan siendo portadores de por vida o ingresen a la fase crónica de la infección. La fase crónica, en su forma grave, se caracteriza por reducción en la producción de elementos sanguíneos de la médula ósea, lo cual redundaría en pancitopenia. El pronóstico para perros con la forma grave crónica es malo. Puede que los perros que se encuentran en esta fase mueran eventualmente de infecciones secundarias o hemorragias incontrolables, o ambas. Por lo tanto resulta de suma importancia identificar la enfermedad antes de que los perros entren en la fase crónica de EMC.

La supervivencia y la multiplicación de organismos de ehrlichia en células infectadas dependen de la habilidad del organismo para inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, como ocurre para *N.risticii* y *N.sennetsu*. (Neer, 1995) se mostró que la doxiciclina restaura la capacidad fagocítica del huésped; es probable que lo haga mediante la inhibición de la síntesis de una proteína bacteriana que retrasa la fusión. (Weiser, et al. 1991) Aparentemente, la inmunidad inducida por células T y la secreción de interferón (IFN)- γ cumplen un papel predominante en la recuperación y la inmunidad a infecciones por ehrlichias. (Brouqui, et al.1997; Waner, et al. 1997) Es posible que la evasión de la respuesta inmune sea otro medio de establecer infección crónica en el huésped canino para *E.canis*.

La infección por *E.canis* da como resultado el desarrollo de anticuerpos específicos. Entre 4 a 7 días después de la infección, aparecen IgM e IgA; en general la IgG aumenta desde los 15 días posteriores a la infección. (Waner, et al. 1997) Por lo regular la hiperglobulinemia es policlonal; sin embargo, es posible que algunos perros desarrollen gammapatía monoclonal.(Harrus, et al. 1996; Van Andel, et al. 1998) El papel que cumple la respuesta de anticuerpos en la eliminación de infecciones intracelulares persistentes de ehrlichia es mínimo. Los títulos altos de anticuerpos a *E.canis* no proporcionan protección cuando se desafía a los animales. (Barnwell, et al. 1994; Ristic, et al. 1988) Es más, es posible que ejerzan un efecto perjudicial en el progreso de la enfermedad debido a las consecuencias inmunopatológicas. (Ristic, et al. 1988) Cada vez mayor cantidad de evidencia confirma la suposición de que los mecanismos hiperinmunes están involucrados en

la patogénesis de EMC. Estos incluyen infiltración generalizada de células plasmáticas de la médula ósea y el parénquima de los órganos, aparición de hipergammaglobulinemia policlonal que no se correlaciona con títulos específicos de anticuerpos a *E.canis*, resultados positivos de pruebas de autoaglutinación y Coombs, inducción de producción de anticuerpos antiplaquetarios después de la infección natural y experimental, y la detección reciente de complejos inmunes circulantes en perros infectados en forma natural y artificial con *E.canis* (Grindem, et al. 1999; Harrus, et al. 2001; Harrus, et al. 1999) Este último hallazgo sugiere que algunas manifestaciones patológicas y clínicas en EMC están mediadas por complejo inmune. No se encontraron anticuerpos antinucleares en perros infectados en forma natural o experimental con *E.canis* lo que sugiere que está en juego otro mecanismo en la patogénesis de EMC.(Harrus, et al. 2001) Es posible que los perros con gammapatía monoclonal desarrollen hiperviscosidad con signos clínicos asociados a lesiones patológicas. Se han documentado casos de ceguera repentina provocada por hemorragia subretinal asociada con hiperviscosidad. (Harrus, et al. 1998; Neer, 1995)

Se ha implicado amiloidosis AA reactiva con proteinuria y glomerulopatía como complicación patológica de infección crónica por *E.canis*. (Luckschander, et al. 2003)

Los cambios hematológicos en EMC están asociados con procesos inflamatorios e inmunes que provoca la infección.

Ocurre trombocitopenia, la anormalidad hematológica más común de perros infectados por *E.canis*, en todas las fases de la enfermedad.(Gaunt, et al. 1996; Harrus, et al. 1999; Harrus, et al. 1996)

Varios mecanismos están involucrados en la patogénesis de la trombocitopenia; estos incluyen el aumento del consumo de plaquetas y disminución de la vida media plaquetaria, probablemente resultado del secuestro esplénico y destrucción mediada por respuesta inmune. Se han detectado anticuerpos antiplaquetarios circulantes y relacionados con plaquetas en suero y en sangre entera, respectivamente, en perros en la fase aguda después de infecciones naturales y artificiales con *E.canis*(Neer

TM. 1995; Waner, et al. 1995) Además, se ha encontrado que existe una citocina sérica, factor de inhibición-migración plaquetaria (FIMP), en perros con ehrlichiosis, y su nivel está relacionado en forma inversa con el recuento de plaquetas.(Abeygunawardena, et al.1990) Niveles de FIMP más altos se asocian con cepas más virulentas de *E.canis*. El FIMP inhibe la migración plaquetaria y es producido por los linfocitos cuando se exponen a monocitos infectados. Se considera que el mecanismo responsable de trombocitopenia en la fase crónica es la disminución de la producción de plaquetas como resultado de una medula ósea hipoplásica.(Harrus, et al. 1999) La función plaquetaria, como la miden las respuestas de agregación, se ve disminuida en perros infectados con *E.canis*. Este hecho, junto con el bajo recuento de plaquetas, contribuye a las hemorragias que se observan con EMC.(Harrus, et al. 1996; Harrus, et al. 1996; Harrus, et al. 1996)

1.3 HALLAZGOS CLÍNICOS

La ehrlichiosis canina es un trastorno multisistémico; en la actualidad, se sabe que lo provoca una variedad de especies de ehrlichia. En el pasado, todos los informes clínicos de esta enfermedad confirmados por medios citológicos o serológicos se atribuyeron a infección por *E.canis*. el siguiente análisis divide en categorías las características clínicas antes publicadas sobre la base de sistemas corporales.

1.3.1 Signos multisistémicos

Una presentación común es depresión, letargia, pérdida de peso leve y anorexia, con o sin tendencias hemorrágicas. Si se presenta hemorragia, en general se exhibe por petequias dérmicas o equimosis, o ambas. A pesar de que pueden ocurrir hemorragias de cualquier superficie mucosa, la epistaxis es más frecuente. El examen físico puede revelar también linfadenomegalia y esplenomegalia en un 20 y 25 % de los paciente, respectivamente.(Woody, 1985)

Otro punto que todos los médicos clínicos deben tener en cuenta cuando consideran una enfermedad transmitida por garrapatas como causa de signos multisistémicos es el problema de la coinfección con múltiples patógenos transmitidos por garrapatas. (Kordick, et al. 1999)

1.3.2 Signos Oculares

Es posible que los perros muestren cambios en el color o la apariencia de los ojos o desarrollen ceguera. Los hallazgos más comunes son uveítis anterior y enfermedad retinal, como corioretinitis, papiledema, hemorragia retinal, infiltrados perivasculares retinales y desprendimiento de retina bulloso, y pueden dar como resultado ceguera aguda. (Gould, et al. 2000)

1.3.3 Signos neuromusculares

Los signos neurológicos de ehrlichiosis son principalmente el resultado de meningitis por inflamación o hemorragias, o ambas. Ocurre disfunción neurológica con daño al tejido nervioso periférico o central. Las infecciones por *E.canis* y cepas granulocitotrópicas han sido comunes.(Maretzki, et al. 1994; Troy, et al. 1990) y los signos no se distinguen de los de la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR). Se han observado convulsiones, estupor, ataxia con disfunción vestibular periférica o central aguda, anisocoria, disfunción cerebelar, temblores intencionales e hiperestesia generalizada o localizada. Se han encontrado mórulas en células de líquido cefalorraquídeo (LCR) en algunos casos.(Maretzki, et al. 1994; Meinkoth, et al. 1998) Dos perros seropositivos a *E.canis* presentaron polimostitis y los signos eran tetraparesia progresiva de aparición aguda, hiporeflexia y consunción muscular. (Buoro, et al. 1990) Los músculos esqueléticos estaban atróficos y caracterizados desde el punto de vista histológico por infiltrados celulares linforeticulares inmaduros y linfoplasmocíticos dentro de áreas de necrosis. Desafortunadamente no se informó la histopatología de los nervios periféricos.

1.3.4 Poliartritis

Es posible que los perros con ehrlichiosis desarrollen cojera con andar endurecido en forma secundaria a poliatropatía. Puede producirse enfermedad de las articulaciones por hemartrosis o deposición de complejo inmune con artritis como resultado y efusión neutrofílica en la articulación. Se ha asociado la mayoría de los casos de poliartritis con infección por cepas granulocitotrópicas (*A.phagocytophilum* o *E.ewingii*) o *N.risticii*(Cowell, et al. 1988; Stith, et al.1996; Stockham, et al. 1992)

Cuando se han determinado los títulos, alrededor del 81% de los perros con la cepa granulocitotrópica han mostrado títulos a *E.canis*, que reacciona en forma cruzada con *E.ewingii*, y el 8% ha presentado títulos a *E.equi*.(Stith, et al. 1996)

1.3.5 Infecciones secundarias concurrentes

Las garrapatas pueden alojar organismos patogénicos múltiples que dan como resultado coinfecciones en el perro infectado. (Cocco, et al. 2003; Kordick, et al. 1999) Deben interpretarse con cuidado los resultados positivos de métodos de detección de ácido nucléico o reactividad de anticuerpos con respecto a *Ehrlichia*, ya que son la única causa de enfermedad clínica, a menos que se haya evaluado una gran variedad de patógenos potenciales. Además, los perros con ehrlichiosis pueden identificarse en forma secundaria con enfermedades oportunistas por protozoos, hongos o bacterias.(Dubey, et al. 2003) Las pruebas de ehrlichia deben considerarse como una evaluación de inmunocompetencia de huésped en perros con diagnóstico de infecciones oportunistas.

Los signos específicos de la especie ehrlichia son que en los perros, las infecciones por *E.canis* pueden ser agudas o crónicas. El perro actúa como huésped reservorio de esta infección, e infecciones persistentes crónicas pueden dar como resultado pancitopenia o hiperglobulinemia. En general, la hiperglobulinemia es policlonal; sin embargo, en ocasiones se ha observado gammapatia monoclonal. Se ha observado linfocitosis granular, que se confundió con leucemia linfocítica bien diferenciada en algunos perros. (Greene, 2008)

Se inoculó *E.chaffensis* en forma experimental en cachorros y los signos fueron leves comparados con los animales correspondientes inoculados con *E.canis*(Dawson, et al. 1992) Solo resultó evidente la fiebre. Este hallazgo, que puede estar relacionado con diferencias de especie o atenuación del agente en cultivo celular, se contrasta con el síndrome clínico observado en personas infectadas con *E.chaffensis*. Todavía no se definió la importancia clínica de las infecciones naturales en perro o gatos.

1.4 DIAGNÓSTICO

En general, el diagnóstico de la ehrlichiosis se basa en una combinación de signos clínicos, anormalidades hematológicas, trombocitopenias y hallazgos serológicos. En la actualidad, se utilizan en mayor medida las técnicas de PCR e inmunotransferencia para obtener un diagnóstico en el entorno clínico, y también se analizan los comentarios específicos sobre el uso de ellas.

1.4.1 Hallazgos de laboratorio clínico

Los cambios hematológicos están mejor documentados en infecciones por *E.canis* e incluyen trombocitopenia (82%), anemia (82%), la que, en general, es no regenerativa, y leucopenia (32% de la cual el 20% presentaba neutropenia). (Troy, et al. 1990; von Stedingk, et al. 1997) En general, la pancitopenia es el resultado de la hipoplasia de las células precursoras de la médula ósea, ocurre en la fase crónica grave (18% de los casos) y, con mayor frecuencia, en los perros Pastores alemanes. (Woody BJ. 1985)

Se ha informado trombocitopenia en forma consistente en todas las etapas de la infección por *E.canis*; como muchas veces es una prueba de chequeo de ehrlichiosis, es posible que esta proporción sea exagerada. (Bulla, et al. 2004) En un estudio de área endémica de Brasil, se observó una correlación general entre los resultados positivos de PCR en sangre de *E.canis* y la presencia de trombocitopenia marcada (<100.000 plaquetas/ μL). (Bulla, et al. 2004) Sin embargo, no debe dejar de considerarse nunca la ehrlichiosis, aunque el recuento de plaquetas sea normal. Debe realizarse serología si otros signos clínicos son compatibles. En otro estudio sobre perros hospitalizados de Brasil, la anemia fue un factor de riesgo epidemiológico de ehrlichiosis mayor que la trombocitopenia. (de Moraes, et al. 2003)

Se ha observado linfocitosis granular con infección por *E.canis*. (Heeb, et al. 2003; Weaver, et al. 1999) Los perros afectados presentaron recuentos de linfocitos absolutos entre 5200 y 17200 células/ μL con una granulación en el citoplasma típica de leucemia linfocítica bien diferenciada. Algunos de estos perros presentaban gammapatía monoclonales, lo que quizás conduzca a un diagnóstico erróneo de

leucemia linfocítica. Por lo tanto las pruebas de ehrlichia en perros deben realizarse cuando se observa linfocitosis bien diferenciada.

Las anomalías químicas de suero más frecuentes han incluido hiperproteinemia (33%), hiperglobulinemia (39%), hipoalbuminemia (43%), y actividades elevadas de alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA) (43 y 31 % respectivamente).(Neer, 1995) La hiperproteinemia es el resultado de niveles elevados de globulina, pero no existe ninguna correlación directa entre los niveles de globulinas séricas y anticuerpos séricos a *E.canis*. La electroforesis sérica muestra en general hiperglobulinemia policlonal, (Harrus, et al. 1997) a pesar de que pueden ocurrir gammapatía monoclonales. Debe medirse el título de anticuerpos a *E.canis* en todos los perros cuando se contempla un diagnóstico de gammapatía monoclonal benigna o no se tiene evidencia definitiva de mieloma, leucemia o macroalbuminemia. En general, los perros infectados, con pancitopenia presentan concentraciones séricas inferiores de globulina y comparados con perros no pancitopénicos.(Harrus, et al. 1997) los perros con *E.canis* presentan con frecuencia plasmacitosis en la médula ósea o a veces en otros tejidos, que pueden confundirse con mieloma de células plasmáticas.(Neer, 1995)

Otros hallazgos clinicopatológicos incluyen resultados positivos de pruebas de anticuerpos nucleares.(Simpson, et al. 1991) proteinuria, hematuria, tiempo de sangrado prolongado (incluso en algunos perros que presentan recuentos normales de plaquetas) y radiopacidad intersticial pulmonar que varía de patrón lineal leve a infiltración intersticial, marcada con opacidades peribronquiales. En forma experimental, el punto máximo de pérdida de proteína en la orina, formada principalmente por albúmina, se observa 2,5 a 3,5 semanas después de la inoculación y se resuelve para la sexta semana después de la infección. (Codner, et al. 1992a; Codner, et al. 1992b) Durante el punto máximo de pérdida, las proporciones de proteína en orina/creatinina variaron de 4,5 a 23,2 (proporción de referencia menor a 1). Se observó una pérdida correspondiente en concentraciones de albúmina sérica (media 2,1 g/dL). El análisis de LCR en perros con signos de enfermedad del sistema nervioso central (SNC) ha revelado aumento del nivel de

proteína y pleocitosis linfocítica predominantemente similar a la encontrada en infecciones virales. (Ramsay, et al. 2002) Se observaron hallazgos en LCR comparables en ehrlichiosis monocitotrópica humana.

1.4.2 Citología

Puede realizarse un diagnóstico definitivo de enfermedad por ehrlichia mediante una demostración de presencia de mórulas en los leucocitos en frotis de sangre o aspirados de tejidos como el bazo, el pulmón o el ganglio linfático. Resulta difícil y lleva tiempo encontrar mórulas, pero esto puede optimizarse mediante la realización de frotis de la cepa leucocítica o examen de frotis delgados de sangre realizados a partir del lecho capilar periférico del margen de la oreja. Pueden visualizarse mórulas dentro de los monocitos presentes en frotis de sangre periférica o líquido sinovial (o ambos) o, en pocas ocasiones, en LCR. Los estudios citológicos de sangre periférica, capa leucocítica, aspirados de ganglio linfático, aspirados de médula ósea y cultivo a corto plazo de especímenes de sangre mostraron mayor sensibilidad en la detección de organismos en capa leucocítica y aspirados de ganglio linfático. (Murphy, et al. 1998) Se encontraron mórulas con mayor frecuencia en linfocitos que en monocitos. Las plaquetas, los gránulos azurófilos linfocíticos, los cuerpos linfoglandulares y el material nuclear fagocitado pueden confundirse con inclusiones de ehrlichia.

1.4.3 Pruebas serológicas

Un diagnóstico de ehrlichiosis se basa en general en resultados positivos de pruebas indirectas de AF. Esta prueba detecta anticuerpos séricos incluso 7 días después de la infección inicial, a pesar de que es posible que algunos de los perros se tornen seropositivos hasta 28 días después de que comienza la infección. Por lo tanto, es posible que un perro esté infectado en forma aguda y no presente título demostrable de anticuerpos séricos. Cuando los resultados de título de anticuerpo a *E.canis* son negativos, se recomienda un examen de seguimiento de 2 a 3 semanas o pruebas séricas en busca de otros agentes. Los niveles de anticuerpos séricos en perros no

tratados llegan a su punto máximo a los 80 días posteriores a la infección. Durante los primeros 7 días después de la infección, el título está formado por IgA e IgM y, para los 20 días, la mayor parte es IgG. La mayoría de los laboratorios miden este anticuerpo. La metodología y los informes difieren entre los laboratorios; por lo tanto, no se llegó a un consenso sobre el nivel absoluto de reactividad. En general, se considera que un título de IgG de 1:80 o mayor es evidencia de infección o exposición o ambos, aunque es posible que este hallazgo varíe según los métodos de cada laboratorio. A la inversa, debido a la persistencia del título medible después del tratamiento o la recuperación potencial, un resultado positivo de título no significa necesariamente que la enfermedad o los síntomas clínicos del animal sean estrictamente el resultado de ehrlichiosis, en especial en áreas endémicas habitadas por animales asintomáticos con títulos a *E.canis*.

En un estudio, el 20.3% de los perros de perreras saludables, presentaron títulos de anticuerpos a *E.canis*. (Hoskins, et al. 1988)

Durante los últimos 14 años, manejamos por lo menos 30 perros que presentaban recuentos de plaquetas inferiores a 50.000 / μ L, y cada uno presentaba títulos positivos a *E.canis* sin aumento concurrente en cantidad de plaquetas después del tratamiento con tetraciclina. Sin embargo, todos evidenciaron aumentos considerables del recuento de plaquetas en respuesta a dosis inmunosupresoras de glucocorticoides. Es muy probable que estos perros tuvieran trombocitopenia mediada por respuesta inmune en forma coincidente o como resultado de exposición a *E.canis* desarrollaron anticuerpos antiplaquetarios, pero en el momento no estaban afectados en forma clínica por la infección por ehrlichia.

Después del tratamiento en la mayoría de los perros, el título declina de manera progresiva y se torna negativo en general de 6 a 9 meses. Es posible que algunos se tornen asintomáticos luego del tratamiento, pero siguen reteniendo títulos muy altos a *E.canis* durante años. (Bartsch, et al. 1996; Perez, et al. 1996)

No siempre puede determinarse si el organismo es persistente. (Bartsch, et al.1996)
Se asume que los perros tratados eliminaron el organismo si se resuelve la

trombocitopenia, la hiperglobulinemia y otras anomalías clínicas y de laboratorio en forma progresiva después del tratamiento.

Existe reactividad antigénica cruzada con *E.canis* y otros organismos de diferentes regiones del mundo. (Hegarty, et al. 1997)

Pueden detectarse las diferencias de las respuestas serológicas mediante análisis Western blot. También ocurre cierto grado de reactividad cruzada entre especies de ehrlichia, que puede presentar problemas en la interpretación de serología de pruebas indirectas de AF en ciertas áreas geográficas. Se ha detectado un desplazamiento de reactividad a varios determinantes antigénicos de *E.canis* en perros durante el curso de la infección. (McBride, et al. 1996)

Se presenta poca reactividad cruzada si es que ocurre, entre *E.canis rickettsia rickettsii* el agente etiológico de FMMR. Como la presentación clínica de estas dos enfermedades es similar, se les deben realizar pruebas a los perros con signos clínicos de ehrlichiosis en ausencia de un título a *E.canis* en busca de FMMR mediante recolección de suero de títulos en pares de IgG, suero de etapa aguda y de dos semanas de convalecencia. *N.helmithoeca* provoca reacciones cruzadas a *E.canis*, *N.risticii* y *N.sennetsu*. (Massung, et al. 2002)

Deben examinarse los títulos a otras ehrlichias según el área geográfica y los signos clínicos compatibles. Los anticuerpos a *E.ewingii* reaccionan en forma cruzada a *E.canis* y *E.chaffensis* y el uso de uno de estos antígenos detecta infección con algunos de los tres, mientras que los sueros con *E.canis* pueden reaccionar en forma cruzada con antígenos *A.phagocytophila*. (Stuen, et al. 2002; Waner, et al. 2000)

No puede realizarse cultivo *in vitro* de *E.ewingii* mas allá del aislamiento en células primarias; por lo tanto, no se dispone de una prueba serológica específica.

Los antígenos con reactividad cruzada están presentes también entre *E.chaffensis* y agente de EGH con sueros humanos pero no caninos. (McBride, et al.1999; Rikihisa, et al. 1994)

E. equi detecta infección con agente de EGH o *A. phagocytophilum* y existe cierta reactividad cruzada entre *N. risticii* y *N. sennetsu*.

Además de pruebas indirectas de AF, puede utilizarse ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos a *E. canis* y anticuerpo circulante en perros. (Futch, et al. 1996) Se ha desarrollado una prueba ELISA “en el lugar de atención” con proteínas recombinantes para pruebas clínicas internas en busca de anticuerpos a *E. canis*. en sus inicios se comercializó esta prueba para tener resultados positivos a una dilución de 1:100 o superior, sin embargo luego se aumentó este nivel a una dilución de 1:500 o superior. Se ha encontrado que otra prueba ELISA en el lugar de atención, Dip-S-Tics (PanBio Index, Inc, Baltimore, Maryland), presentaba sensibilidad superior pero especificidad inferior a Snap Canine Combo y menor exactitud que la prueba Snap 3Dx cuando se le comparó con el ensayo indirecto de AF. (Bélanger, et al. 2002) también se ha desarrollado en Israel (Inmmuno Comb, Biogal, Kibbutz Gal’ed, Israel) una prueba interna ELISA con rickettsias enteras que pueden diferenciar claramente muestras seronegativas a *E. canis* de aquellas que presentan títulos de 1:320 por lo menos. (Waner, et al. 1998) No se evaluaron de modo adecuado los títulos en el rango de 1:80 y 1:160 con una gran cantidad de muestras, sin embargo, se estableció una reacción positiva en 1:80. Ambos kits de prueba pudieron diferenciar muestras seronegativas a *E. canis* de aquellas otras con títulos superiores a 1:320. (Harrus, et al. 2002) En los casos que involucran títulos bajos, es posible que la repetición de la prueba serológica después de varias semanas arroje un resultado positivo.

Con la aparición de pruebas de chequeo disponibles con facilidad, se ha encontrado que los animales saludables desde el punto de vista clínico muestran aumento de títulos de anticuerpos séricos a *Ehrlichia* o *Anaplasma*, es posible que algunos de estos resultados sean positivos en forma errónea puesto que son provocados por la exposición a rickettsias menos patogénicas que reaccionan en forma cruzada. Cuando se utilizan pruebas de reconocimiento basadas en proteínas, puede que no se detecten infecciones con otras rickettsias significativas desde el punto de vista clínico y, en algunos casos, es posible que no se encuentren las verdaderas

infecciones. Es posible que sean necesarias pruebas como análisis de Western Blot o PCR para resolver algunos de estos problemas. Por lo tanto el tratamiento de perros seropositivos es controvertido.

Los animales infectados sanos desde el punto de vista clínico podrían servir como reservorio de *E.canis* a pesar de que puede superarse este riesgo mediante el control más intensivo de vectores. Se desconoce la posibilidad de que los animales infectados en forma subclínica progresen a la fase crónica de la enfermedad. Es posible que algunos nunca desarrollen inmunidad permanente, y que la infección vuelva a aparecer si ocurre reexposición en su ambiente. En teoría el tratamiento indiscriminado de todos los animales seropositivos puede conducir a resistencia futura de estos organismos a las tetraciclinas; sin embargo, hasta el momento no se ha informado de este tipo de resistencia. (Greene, 2008)

1.4.4 Análisis blot

Con fines de investigación se han utilizado análisis Western blot y PCR para describir y distinguir entre infecciones con diferentes organismos que provocan ehrlichiosis, anaplasmosis o neorickettsiosis, y es posible que se compruebe en el futuro que resultan útiles desde el punto de vista clínico. (Brouqui, et al. 1992 ; Dawson, et al. 1996)

Los análisis blot de *E.canis* muestran una gran cantidad de antígenos que reaccionan; los más prominentes son los que separan en una banda ancha de 22 a 30 kDa. (Hegarty, et al. 1997; Inokuma, et al. 2001)

Una proteína de 30 kDa es el principal antígeno reconocido en sueros caninos infectados en forma natural y experimental. (Park, et al. 2003) Recientemente se describió la principal proteína antigénica 2, una proteína de 27 kDa, y se sugirió que funcionaba como herramienta de diagnóstico de EMC. (Bélanger, et al. 2002) Mas recientemente se ha mostrado que la proteína de 120 kDa (p120) y la proteína rP43 son muy específicas de *E.canis*, y es posible que sean antígenos potenciales de serodiagnóstico de ehrlichiosis canina. (Maurin, et al. 2003; Mylonakis, et al. 2003) El análisis Western blot detecta anticuerpos a *E.canis* incluso 2 a 8 días después de la

exposición. Y las pruebas de PCR arrojan resultados positivos incluso 4 a 10 días después de la exposición a *E.canis* en estudios experimentales. (Iqbal, et al.1994; Brouqui, et al. 1992) La prueba indirecta de AF también se torna positiva dentro de un marco de tiempo similar. Después de un punto de vista clínico práctico la prueba indirecta de AF sigue siendo la prueba de chequeo inicial por excelencia. El análisis Western blot también ha resultado útil para distinguir entre infecciones por *E.canis* y *E.ewingii*. (Rikihisa, et al. 1994) Esta característica resulta beneficiosa porque la mayoría de los perros con infección por *E.ewingii* muestran títulos positivos de prueba indirecta de AF a *E.canis* No se dispone de pruebas indirectas de AF para *E.ewingii*.

1.4.5 Cultivo de organismos

Es posible que los cultivos sanguíneos tarden hasta semanas en mostrar crecimiento. No se dispone de este método como rutina, resulta caro y es altamente específico del organismo que provoca la infección, sin embargo, se lo considera una herramienta de investigación.

1.4.6 Detección del ácido nucléico

Se ha demostrado que la PCR es un método sensible para detectar infección aguda experimental por *E.canis* en perros. (Engvall, et al. 1996; McBride, et al. 2001) con frecuencia dentro de los 4 a 10 días posinoculación y antes de que ocurra seroconversión. No resulta clara la sensibilidad de la PCR de sangre en el perro infectado en forma natural. Las dificultades en la extracción del organismo, los problemas inherentes a la técnica y la selección inapropiada de la muestra provocan resultados falsos negativos. La razón principal de que ocurran resultados falsos negativos es la amplificación no específica o la contaminación de las muestras durante su manejo o durante la realización de las pruebas. Las técnicas y los reactivos de laboratorio actuales no están estandarizados. Han surgido pocos

informes sobre el uso de PCR en sangre para diagnóstico inicial de ehrlichiosis canina ocurrida en forma natural cuando se comparó el resultado de la PCR en sangre con el de la prueba indirecta de AF. En un estudio se observó una correlación débil entre los títulos de prueba indirecta de AF y resultados de PCR. (Stiles, 2000) En este estudio 13 de 49 (27%) mostraron un resultado positivo de PCR en sangre, mientras que los resultados de prueba indirecta de AF de anticuerpos a *E.canis* fueron positivos en todos los perros. También se encontró una correlación débil entre resultados de PCR en sangre comparados con resultados de pruebas indirectas de AF en un estudio reciente en Tennessee, donde 10 perros de 90 mostraron resultados positivos a pruebas indirectas de AF y no se halló que fueran positivos a PCR en sangre. (Standaert, et al. 1995) También se informó esta falta de correlación que puede indicar insensibilidad del método de PCR en sangre o exposición con depuración del organismo en seres humanos con EGH. (Bakken, et al. 2002) En este estudio los títulos de etapa convaleciente de pruebas indirectas de AF fueron más sensibles que la PCR para confirmar el diagnóstico de EGH. La insensibilidad de PCR en sangre resulta evidente por que el ADN de la ehrlichia puede amplificarse desde el bazo, mientras que no puede amplificarse en especímenes sanguíneos correspondientes. (Harrus, et al. 1998) La selección apropiada de especímenes de tejido o líquidos corporales es importante. Por lo tanto para un diagnóstico positivo mediante amplificación de ADN de ehrlichia. La sensibilidad de PCR en sangre para la confirmación inicial de infecciones no es suficientemente alta en forma consistente como para recomendarla como única prueba de diagnóstico de ehrlichiosis. Debe usarse junto con serología para detectar animales infectados en forma aguda antes de la seroconversión. Puede considerarse la PCR de aspirados de bazo como alternativa más sensible que PCR en sangre, en especial en tratamiento de seguimiento. (Harrus, et al. 2004) Con infecciones localizadas, es posible que los ensayos de líquido articular, LCR o humor acuoso resulten más beneficiosos. Además, a medida que se refina la PCR, quizás se compruebe que resulta útil para detectar a los animales tratados con infección persistente por *E.canis* de aquellos que retienen títulos persistentes altos de pruebas indirectas de AF después de un tratamiento exitoso. (Iqbal, et al. 1994; Wen, et al.

1995) Aparte de cultivo de organismos la PCR es el medio más específico para determinar la especie de rickettsia que infecta a un animal. Es más, pueden desarrollarse iniciadores para controles específicos de género para determinar la cantidad de reacciones específicas que deben realizarse. Se ha desarrollado un ensayo de PCR en tiempo real para detectar *E.chaffensis*.

1.4.7 Hallazgos patológicos

Las hallazgos patológicos de perros infectados por *E.canis* incluyen hemorragias petequiales y equimóticas en la superficie de las mucosas y serosas de la mayoría de los órganos incluso de la cavidad nasal, el pulmón, el riñón, la vejiga urinaria, el tracto gastrointestinal (GI) y el tejido subcutáneo. Se presenta linfadenomegalia, esplenomegalia y hepatomegalia generalizadas con mayor frecuencia durante la fase aguda. (De Castro, et al. 2004; Greene, et al.1984) Es posible que todos los ganglios linfáticos estén agrandados y muestren una decoloración amarronada. Un hallazgo adicional en casos crónicos es emaciación con pérdida de condición corporal general. La médula ósea es hipercelular y muestra un color rojo en la fase aguda, aunque con la enfermedad crónica se torna hipoplásica y muestra un color pálido por decoloración grasa.

Uno de los hallazgos histopatológicos más característicos es un infiltrado de célula plasmática perivascular en gran cantidad de órganos incluidos los pulmones, el cerebro, las meninges, los riñones, los ganglios linfáticos, la médula ósea, el bazo y a veces la piel o mucosa. Parece que el grado de infiltrados de célula plasmática y linfoide aumenta en los perros afectados de forma crónica. (Lockhart, et al. 1997) Resulta difícil detectar de forma histológica los organismos de ehrlichia en tejidos fijados en formalina o solución de Bouin. Con poca frecuencia se observan mórulas en células fagocíticas mononucleares en tejidos coloreados con hematoxilina y eosina. (Greene, et al.1984) Es posible que la dificultad para encontrar organismos en forma histológica explique la razón por la cual no se diagnostica con frecuencia la enfermedad en la necropsia.

En el SNC se observa una meningoencefalitis no supurativa multifocal que involucra el tronco encefálico, el cerebro medio y la corteza cerebral. La mayoría de las lesiones se ubican en dirección ventral en el tronco encefálico y alrededor de la materia blanca y gris periventricular. (Trapp, et al. 2002) Solo ocurre una encefalitis muy leve del cerebelo. Con frecuencia la encefalitis en EMC es acompañada de manguito vascular neuroparenquimatoso leve y gliosis. El infiltrado de células inflamatoria meníngea puede ser monocítico o linfoplasmocítico o ambos. (Neer 1995; Pancholi, et al. 1995) En la necropsia se presentan lesiones meníngeas microscópicas en casi todos los perros aunque algunos muestran signos clínicos de meningitis.

Se ha informado que los signos clínicos involucran casi toda la estructura del ojo, estos incluyen conjuntivitis, petequias o equimosis en la conjuntiva o iris, edema corneal, uveítis e hipema. También es posible que ocurra hemorragia subretinal y desprendimiento retiniano. En un estudio, se examinaron en forma histológica los ojos de perros infectados en forma experimental con *E.canis*. (Pancholi, et al.1995) Ocurrió uveítis en cada uno de los perros infectados con el organismo. El infiltrado inflamatorio era predominantemente linfocítico, monocítico y plasmocítico. La inflamación ocular fue la más común en el cuerpo ciliar y se tornó menos intensa en el coroides, el iris y la retina respectivamente. Los cambios pulmonares en la ehrlichiosis consistentes son neumonía intersticial. En los inicios, se produce acumulación subendotelial de células mononucleares y es posible que se presenten hemorragias alveolares e intersticiales. Se pueden encontrar organismos de *E.canis* en células mononucleares septales y macrófagos del endotelio vascular pulmonar.

Es posible que ocurra glomerulonefritis y plasmocitosis intersticial en perros con ehrlichiosis y esto puede explicar la proteinuria de algunos casos. Se observan cambios histológicos mínimos en riñones de perros infectados en forma experimental con *E.canis*. Sin embargo al examen ultraestructural mostró fusión de proceso de podocitos que coincidieron con el desarrollo de la proteinuria.

1.5 TRATAMIENTO

1.5.1 Farmacoterapia específica

Los agentes antirickettsias y los cuidados de apoyo forman el tratamiento para la ehrlichiosis canina. Los fármacos eficaces han incluido tetraciclinas, cloranfenicol, diprionato de imidocarb y amicarbalida. En general cuanto antes se comience el tratamiento durante el proceso de enfermedad, más favorable serán el pronóstico y el resultado, porque resulta difícil tratar a los perros en fase crónica grave. (Murphy, et al. 1998) Es posible que en estos perros sea difícil resolver los cambios inflamatorios multisistémicos y la mielosupresión.

En el pasado se consideraba que los mejores fármacos iniciales eran la tetraciclina y oxitetraciclina, y aun funcionan correctamente, aunque en la actualidad se utilizan con mayor frecuencia la doxiciclina y la minociclina. Estas últimas son tetraciclinas semisintéticas y solubles en lípidos que se absorben con facilidad para provocar concentraciones altas en sangre, tejido e intracelulares. Como es posible que las ehrlichias persistan en forma intracelular, es importante la penetración del fármaco en la célula para eliminar la infección. Por lo tanto, pueden administrarse tetraciclinas solubles en lípidos por un periodo más corto y a dosis más bajas que las tetraciclinas sin dejar de ser eficaces. El periodo de tratamiento sugerido con doxiciclina es de 7 a 10 días, aunque un estudio encontró que la doxiciclina (10mg/kg por día) durante 7 días no resultó eficaz para eliminar la infección por *E.canis* inducida en forma experimental a partir de 3 a 5 perros. (McBride, et al. 2001) En otros estudios, la doxiciclina (5mg/kg 2 veces por día) utilizada durante 10 a 14 días resultó ser eficaz para eliminar la infección por *E.canis* inducida en forma experimental a partir de 8 de 8 y 13 de 13 perros infectados en forma aguda, respectivamente.(Breitschwerdt, et al.1997; Breitschwerdt, et al.1998; Mylonakis, et al. 2003; Neer, et al. 2002) Todavía se debate la posibilidad de que estos tiempos de tratamiento más corto sean adecuados en casos que ocurren de forma natural, algunos autores encontraron que es posible que incluso un curso de doxiciclina de 6 semanas no sea suficiente para eliminar los parásitos de *E.canis* de todos los perros infectados en forma

subclínica.(Harrus, et al. 1998c) La duración estándar del tratamiento en la infección natural es de 21 a 28 días y la declaración consensuada de ehrlichia del Colegio Americano de Medicina interna Veterinaria recomienda un mínimo de 10 mg/kg por día durante 28 días.

En general ocurre una mejoría clínica importante dentro de las 24-48 horas posteriores al inicio del tratamiento con tetraciclinas en perros con enfermedad en fase aguda o fase crónica leve. El recuento de plaquetas comienza a aumentar de forma correspondiente durante este tiempo y por lo común, se encuentra dentro del rango normal para los 14 días después del tratamiento. No se equipara la recuperación con la inmunidad permanente y los perros pueden volver a infectarse con *E.canis* después del tratamiento anteriormente eficaz. La inmunidad parcial de hecho se desarrolla, ya que la reinfección experimental con cepas heterólogas han provocado manifestaciones de enfermedad más graves que las de cepas homólogas.(Breitschwerdt, et al.1997) Puede considerarse la administración intramuscular (IM) de oxitetraciclina de acción retardada de larga duración cuando resulta difícil la administración oral del fármaco debido a los signos neurológicos o GI o cuando se anticipa el cumplimiento con la administración del fármaco. (Kikuvi, et al. 2001)

Se ha recomendado cloranfenicol para cachorros menores de 5 meses para prevenir la decoloración amarillenta de los dientes debido a las tetraciclinas. Sin embargo, es menos probable que la doxiciclina provoque este efecto. Debe utilizarse cloranfenicol en perros que presentan infecciones persistentes a pesar del tratamiento con tetraciclinas. (Trapp, et al. 2002) No obstante debido a riesgos de salud pública asociados con cloranfenicol y a su interferencia directa con la síntesis de médula ósea y hematopoyética, debe evitarse su administración en perros anémicos o pancitopénicos de ser posible.

Otros agentes antibacterianos que no son eficaces contra *Ehrlichia* spp. monocitotrópica en los seres humanos son la eritromicina, macrólidos nuevos (azitromicina, claritromicina y telitromicina), penicilinas y aminoglucósidos. La eficiencia de las quinolonas varía según el fármaco utilizado y el organismo

involucrado. *N.sennetsu* es susceptible a la ciprofloxacina in vitro. (Brouqui, et al. 1990) Se ha mostrado que la enrofloxacin es eficaz para el tratamiento de FMMR experimental en perros. (Breitschwerdt, et al. 1991) En contraposición, *E.chaffensis* fue resistente a ciprofloxacina pero sensible a la doxiciclina, la rifampina in vitro. (Brouqui, et al.1992) Además de la doxiciclina, la rifampina y las fluoroquinolonas muestran actividad in vitro contra *E.phagocytophilum*. (Klein, et al.1997) Se ha evaluado la eficacia de la enrofloxacin para el tratamiento de infección por *E.canis* inducida en forma experimental. (Madigan, et al. 1996) Con una dosis de 5 mg/kg 2 veces por día y 10 mg/kg por vía oral 2 veces por día durante 21 días, 6 de 7 y 5 de 5 perros respectivamente, permanecieron trombocitopénicos y positivos a cultivos sanguíneos después de cada régimen de tratamiento. De los 5 últimos perros, 3 mostraron mejoría de los recuentos de plaquetas al finalizar el tratamiento con enrofloxacin. Los 12 perros fueron tratados con doxiciclina (5mg/kg 2 veces al día, oral durante 10 días), arrojaron resultados negativos de cultivos sanguíneos, y los recuentos de plaquetas volvieron a ser normales. Sobre la base de estos resultados, no parecería que la enrofloxacin fuera eficaz contra *E.canis*. En otro estudio, los autores trataron a 6 perros con enrofloxacin (5mg/kg 1 vez al día durante 15 días) y encontraron mejoría clínica y de laboratorio en los 6 en el día 15 del periodo de tratamiento. (Kontos, et al. 1998) Se desconoce la posibilidad de que los recuentos plaquetarios hayan disminuido varias semanas después del tratamiento. Es interesante observar que, recientemente se ha evaluado la eficacia de la enrofloxacin contra *E.canis* o su falta, con un estudio in vitro que mostró que el genogrupo de *E.canis* presentaba resistencia natural mediada por girasa a fluoroquinolonas. (Matthewman, et al. 1996)

El imidocarb, es un fármaco antiprotozo, ha resultado exitoso para tratar infecciones resistentes a *E.canis*. (Matthewman, et al. 1993) Este fármaco persiste en los tejidos hasta 1 mes inclusive después de una dosis. Cuando se administró imidocarb como inyección IM única, el 83.9% de los perros con ehrlichiosis se recuperó. Parece que el tratamiento exitoso de *E.canis* con imidocarb es resultado de la exposición prolongada del organismo al fármaco, ya que el crecimiento in vitro de *E.canis* no se ve afectado por la exposición a corto plazo (3 días) de niveles

aparentemente bajos o altos de imidocarb. (Kelly, et al. 1998) Los efectos secundarios transitorios del dipropionato de imidocarb que dependen de la dosis incluyen salivación excesiva, descarga nasal serosa, diarrea, disnea. Es posible que estos signos sean resultado de un efecto anticolinesterasa. En un estudio comparativo de tres vías de la eficacia de la doxiciclina (10mg/kg durante 28 días) vs dipropionato de imidocarb (5mg/kg IM 2 veces con 3 semanas de diferencia) vs tratamiento de combinación de doxiciclina-imidocarb (con el mismo régimen de dosis) en ehrlichiosis ocurrida en forma natural) no se encontraron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre grupos de tratamiento. (Sainz, et al. 2000a.) Se consideró que alrededor del 93 al 94% de los perros respondieron en este estudio sin importar el grupo de tratamiento al que fueron asignados. Sobre la base de este hallazgo, se puso en tela de juicio la eficacia clínica del dipropionato de imidocarb sobre la doxiciclina. (Kleiter, et al. 2001)

La amicarbalida es una carbanilida estrechamente relacionado que se ha utilizado para tratar ehrlichiosis.

Además del tratamiento antimicrobiano, quizás se justifique la fluidoterapia de apoyo para la deshidratación o las transfusiones sanguíneas si el perro se encuentra gravemente anémico. Las transfusiones sanguíneas no aumentan en forma significativa las cantidades de plaquetas por lo tanto es posible que sea necesario plasma rico en plaquetas en una situación de emergencia. Faltan datos para confirmar el uso de factores de crecimiento como eritropoyetina y factor estimulador de crecimiento de granulocitos. Sin embargo los resultados de un solo informe de caso sugieren que podrían ser útiles para el tratamiento de ehrlichiosis crónica grave. (Aroch, et al. 2001)

El tratamiento a corto plazo (2 a 7 días) con dosis inmunosupresoras de glucocorticoides (2mg/kg de prednisona) puede resultar beneficioso durante la etapa temprana del periodo de tratamiento, cuando se presenta trombocitopenia grave o que constituye un riesgo para la vida. Un mecanismo mediado por respuesta inmune es responsable, en parte de la trombocitopenia y la disminución de la función plaquetaria. La lógica sobre el uso de tratamiento con prednisona cuenta con una

base científica. Algunos médicos clínicos prefieren utilizar glucocorticoides y tetraciclinas combinados al comienzo debido a la dificultad para distinguir ehrlichiosis canina de trombocitopenia mediada por respuesta inmune y debido al tiempo de retardo antes de que se disponga de los resultados de las pruebas serológicas. Cuando no se realizan pruebas serológicas, el uso exclusivo de tetraciclinas al comienzo permite un diagnóstico terapéutico por mejoría clínica en 24 a 48 horas. En estas situaciones no deben excluirse los glucocorticoides si la hemorragia constituye un riesgo de muerte, dado que estos ayudan a reducir la tendencia a la hemorragia en varios trastornos trombocitopénicos primarios. Es posible que los glucocorticoides resulten útiles en el tratamiento de otras condiciones mediadas por respuesta inmune asociadas con ehrlichiosis, como poliartritis, vasculitis y meningitis. En un estudio con meningitis secundaria a ehrlichiosis granulocitotrópica, se necesitaron glucocorticoides además de doxiciclina antes de lograr la resolución clínica de los signos. (Greene, 2008)

1.5.2 Tratamiento de control

Es importante controlar la respuesta al tratamiento de infecciones por ehrlichia porque algunas especies pueden provocar infecciones persistentes. La resolución de la trombocitopenia es el desarrollo más rápido que puede ocurrir dentro de un periodo de 7 a 10 días después del tratamiento. Como la infección puede recrudecer, deben evaluarse los recuentos de plaquetas por lo menos 1 a 3 meses luego de detener el tratamiento. La resolución de los cambios en proteínas séricas provocadas por hiperglobulinemia puede llevar incluso 6 a 12 meses. Resulta muy difícil seguir los títulos específicos de anticuerpos a *Ehrlichia* de alta magnitud porque la mayoría de los laboratorios informan un valor máximo en lugar de un criterio de valoración de dilución y con frecuencia, la disminución de estos niveles altos no es lineal con respecto al tiempo. En algunos perros, se resuelven todas las anomalías clínicas y de laboratorio ; sin embargo, es posible que presenten un título de anticuerpos persistentemente alto. En estos casos, se puede justificar la evaluación de la PCR, quizás de un aspirado de bazo. En algunos de estos casos, como con otras enfermedades infecciosas, es posible que continúe el aumento de

los títulos de anticuerpos séricos después de la eliminación del organismo, no obstante, todas las anormalidades clínicas y de laboratorio deberían resolverse si se toma en cuenta esta conclusión. Además los perros pueden volver a infectarse después de la recuperación, en especial cuando viven en ambientes altamente endémicos. Por lo tanto puede resultar difícil comprobar la eliminación de la infección después del tratamiento. Si un animal no muestra mejoría clínica luego de regímenes de tratamiento recomendados, debe considerarse otra causa de enfermedad o causa que la agrave. La mayoría de los perros con infecciones por ehrlichia muestran cierta resolución de la enfermedad clínica dentro de las 24 a 48 horas de la implementación del tratamiento, incluso si los parámetros de laboratorio clínico permanecen anormales. A pesar de que puede eliminarse predecible la infección de los perros infectados en forma experimental con regímenes apropiados, se sabe que resulta preocupante en cierto modo el hecho de que las infecciones naturales en algunas áreas del mundo sean más resistentes al tratamiento. Además en un caso en el que se trataron perros con varias infecciones por ehrlichia, ésta pareció más resistente a la doxiciclina. (Breitschwerdt, et al. 1998) es posible que esta resistencia evidente a la terapia involucre en realidad reinfección en condiciones naturales en ambientes infestados de garrapatas.

1.6 PREVENCIÓN

En la actualidad, no se dispone de una vacuna; por lo tanto, la quimioterapia, la quimioprofilaxis y las medidas de control de garrapatas son medios principales de prevención. En comparación con perros no tratados, la seroconversión en perros que ingresaban en un área endémica de infección por *E.canis* era reducida si se los trataba con Fipronil 1 vez por mes. (Davoust, et al. 2003) Para infecciones a *E.canis* en perrera, se ha mostrado que la tetraciclinas un fármaco profiláctico eficaz contra la reinfección inicial o reinfección cuando se le administra vía oral en dosis de 6.6 mg/kg/día. La aplicación indiscriminada de este fármaco a todos los perros conducirá, en teoría, a resistencia al mismo.

Puede lograrse el control en áreas endémicas si se mantienen programas estrictos de control de garrapatas para los perros y las instalaciones, mediante el uso de la

prueba indirecta de AF para identificar perros expuestos e infectados, mediante el tratamiento de todos los infectados con el régimen terapéutico de tetraciclina. Deben realizarse pruebas serológicas a todos los animales que ingresan a una perrera, se los debe tratar por garrapatas y aislarlos hasta disponer de los resultados. Cuando estas medidas fallan, quizás el único recurso sea mantener a los perros (susceptibles y tratados con éxito) con niveles profilácticos de tetraciclina. Si se siguen estas pautas, debería quebrarse el ciclo de infección por *E.canis* en la garrapata, porque no ocurre transmisión transovárica de *E.canis* en garrapatas *Rhipicephalus*. Como *R.sanguineus* es la única garrapata residente y prefiere alimentarse de perros en todas las etapas, es importante para mantener las infecciones de *E.canis* en ambientes de perreras. La importación de perros infectados con *E.canis* o garrapatas *R.sanguineus* infectadas es un riesgo continuo en países como el Reino Unido, donde la ehrlichiosis canina no es endémica. (Shaw, et al. 2001) Deben tomarse recaudos para revisar a los perros que ingresan y buscar ehrlichiosis mediante métodos serológico. Con las otras especies de ehrlichia, anaplasma y neorickettsia, las garrapatas de exterior son fuentes de infección en potencia junto con múltiples huéspedes reservorio de vida silvestre no identificados aun. La única solución son las medidas de control de garrapata en perros susceptibles.

1.7 CONSIDERACIONES DE SALUD PÚBLICA

Antes de 1986, la única especie de ehrlichia reconocida como infectante de seres humanos era *N.sennetsu*. Este agente primero aislado en Japón es responsable de un leve síndrome tipo mononucleosis. Desde entonces se ha informado que dos agentes nuevos de ehrlichia provocaron la enfermedad en seres humanos en los Estados Unidos. El primero es *E.chaffensis*, el agente causal de EMH (Anderson, et al. 1991; Santarém, et al. 2000; Stafford, et al. 1999) que se presenta como una enfermedad aguda similar a la gripe, caracterizada por fiebre, cefalea, malestar y a veces muerte en seres humanos afectados en forma grave. *E.chaffensis* está estrechamente relacionada con *E.canis* y los perros no desarrollaran la enfermedad

clínica a pesar de que pueden infectarse en forma experimental. (Dawson, et al.1992) Las infecciones naturales en los perros pueden desarrollar un curso diferente. Es probable que la EMH, que predomina en el Sur y sudoeste de los Estados Unidos, involucre un ciclo silvestre en la naturaleza, con ciervos, roedores o ambos como huéspedes reservorios y *A.americanum* (o quizás *D.variabilis*) como vectores más probables. A pesar de que los reservorios de vida silvestre son más importantes, los perros podrían ser portadores de *E.chaffensis* en regiones geográficas endémicas, Es posible que los perros estén involucrados en el transporte de garrapatas en cercanías a seres humanos, y un riesgo posible podría ser un papel que cumple el manejo de garrapatas o sus excreciones o fluidos corporales. Además se ha sugerido que el agente de ehrlichiosis humana venezolana es una variante de *E.canis* o una subespecie de esta transmitida por *R.sanguineus*. (Neer, 1995; Unver, et al. 2001) Por lo tanto, en América del Sur, es posible que los perros sirvan de reservorio de ehrlichiosis humana venezolana y *R.sanguineus* podría servir de vector. Desde hace años se conoce el riesgo potencial de transmisión de ehrlichiosis perros por transfusiones sanguíneas, y este hecho se está volviendo también una preocupación en aumento en medicina humana de transplantes. (Liddell, et al. 2002; McBride, et al. 2000; Rosenfeld-Aguero, et al. 1996; Sadikot, et al. 1999; Talbot, et al. 2003)

Y considerando lo anterior, podemos observar que no se ha reportado en estudios diversos los hallazgos hematológicos más comunes de los pacientes caninos con ehrlichiosis en fase crónica o en fase subclínica, por lo que este estudio pretende describir dichos cambios en estos tipos de pacientes ya que es de gran utilidad observar esto, debido a que pueden existir variaciones en los valores de referencia que se podrían asociar a otras patologías y no a la infección con *E.canis*. Además no siempre se tienen a la mano los métodos definitivos de diagnóstico, con lo que se podría correlacionar la signología clínica de haberla y con los hallazgos al hemograma para así poder acercarse más a un diagnóstico presuntivo más certero.

2. OBJETIVOS

- Determinar la prevalencia de *E.canis* por método de ELISA en perros parasitados con garrapatas de la ciudad de Lázaro Cárdenas, Michoacán.
- Categorizar por raza, sexo y edad a los perros positivos a *E.canis*.
- Categorizar valores hematológicos en alto, normal o bajo con respecto a los intervalos de referencia del hemograma en los perros positivos a *E.canis*.
- Correlacionar los resultados con lo reportado en la literatura actual.

3. HIPÓTESIS

Los perros con ehrlichiosis crónica presentan anemia, trombocitopenia y leucopenia por aplasia medular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre los meses de Febrero a Junio de 2011, en la ciudad de Lázaro Cárdenas, Michoacán, México, ubicado al sur de este estado, justo en la frontera con el estado de Guerrero, que está delimitada por el Río Balsas, además colinda con el océano Pacífico; se encuentra en las coordenadas 17°57'22"N 102°11'32"O a una altitud de 10 metros sobre el nivel del mar. Cuenta con una población de 178,817 habitantes hasta el 2010 según el INEGI. Su clima es tropical con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 1,276.8 milímetros y una temperatura media anual de 27,8 °C. Su ecosistema consiste en bosque tropical deciduo y su flora nativa consiste en papaya, zapote, mango, tepeguaje, congolote, parota y ceiba, palma, coco, anona, coyol, enandi y cuéramo. Además dentro de la fauna endémica de esta región consta de armadillo, cacomixtle, zorro, tlacuache, venado, coyote, nutria, ocelote, jabalí, pato, cerceta, faisán, además de muchas otras especies marinas. (Gobierno del estado 2011; INEGI 2011).

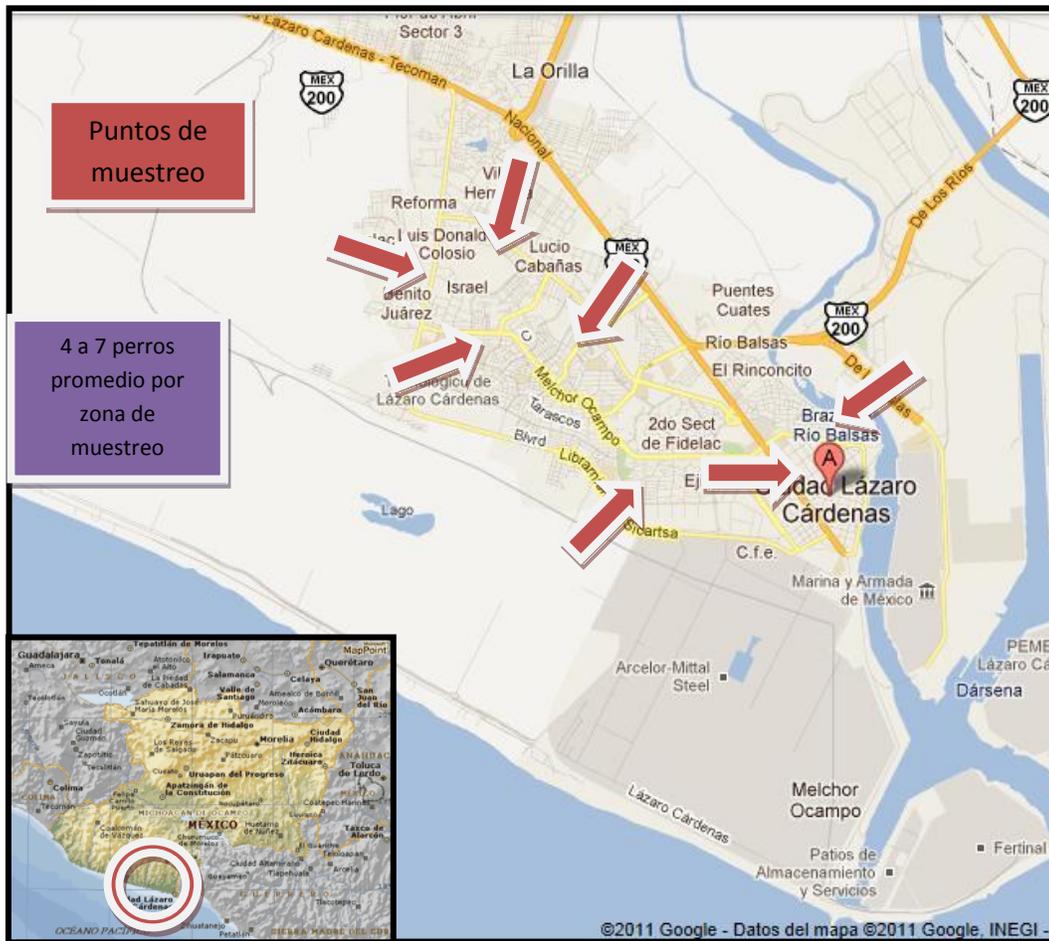


Figura 4.1 Mapa de localización y distribución del estudio.

Como se muestra en la figura 4.1, se localiza la región, así como la distribución de toma de muestreo para la realización de este estudio, para lo cual fueron seleccionadas 7 zonas urbanas en la entidad antes descrita, en las cuales se obtuvieron por zona en promedio 4 a 7 muestras de sangre periférica venosa por venopunción (vena cefálica o safena) de perros (*Canis familiaris*) conforme a la NOM-062-ZOO-1999 y cuyos propietarios refirieron haber estado expuestos dentro de los 3 últimos meses al vector de la enfermedad en estudio, en este caso la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* o en su defecto que fueran portadores del mismo al momento de la revisión, y que no tuvieran signos clínicos de la enfermedad, además éstos no deberían haber sido tratados recientemente (durante

el último mes) con antibióticos. Si cumplían con los requisitos se procedía a tomar la muestra de sangre con una jeringa de 3 ml de capacidad, con aguja hipodérmica, una vez obtenidas las muestras, siendo una cantidad mínima de muestreo 1 ml. de sangre, se depositaron de forma inmediata (previo retiro de la aguja para evitar la hemólisis) en tubos con ácido etildiaminotetracético (EDTA) para impedir la coagulación de la sangre, posteriormente se mezclaron suavemente y se dejaron reposar por 30 min, enseguida se colocaron en una hielera con refrigerante a una temperatura de 2 - 4 °C donde fueron transportadas a la ciudad de Morelia, Michoacán; esto debido a que en el lugar donde se realizó el presente trabajo no hay algún lugar que brinde el servicio de estudios de laboratorio especializado en animales ni hay personal capacitado para su procesamiento. Una vez llevadas a dicha ciudad se realizaron las pruebas de ELISA consistente en un kit de diagnóstico llamado “Canine Snap 4Dx” (IDEXX) para detectar anticuerpos contra *Ehrlichia canis*; dicha prueba es cualitativa y presenta una sensibilidad del 97% (aunque dependiendo de la cantidad de títulos puede verse mas “fuerte” la reacción de coloración durante el procedimiento, o muy tenue si la reacción de aglutinación fuera moderada en caso de haber pocos títulos). El procedimiento para realizarla consistió en (ver figura 4.2):

1. Se dejó que la muestra alcanzara la temperatura ambiente aproximadamente durante 30 minutos, pues estas habían sido refrigeradas (no se calentaron como se indica en las instrucciones del kit).
2. Se tomó con una pipeta (incluida en el kit) 3 gotas de la muestra y se colocaron en un tubo de ensayo nuevo.
3. Se agregó 4 gotas del conjugado (solución incluida en el Kit), al mismo tubo de ensayo sosteniendo en posición vertical.
4. Enseguida se tapó el tubo de ensayo y se mezcló a fondo, invirtiendo entre 3 a 5 veces.
5. Se colocó el dispositivo sobre una superficie horizontal, agregando el contenido del tubo de ensayo en el pocillo de muestras del dispositivo. Teniendo cuidado de no verter el contenido fuera de dicho pocillo.



Figura 4.2 Método para realizar prueba de ELISA

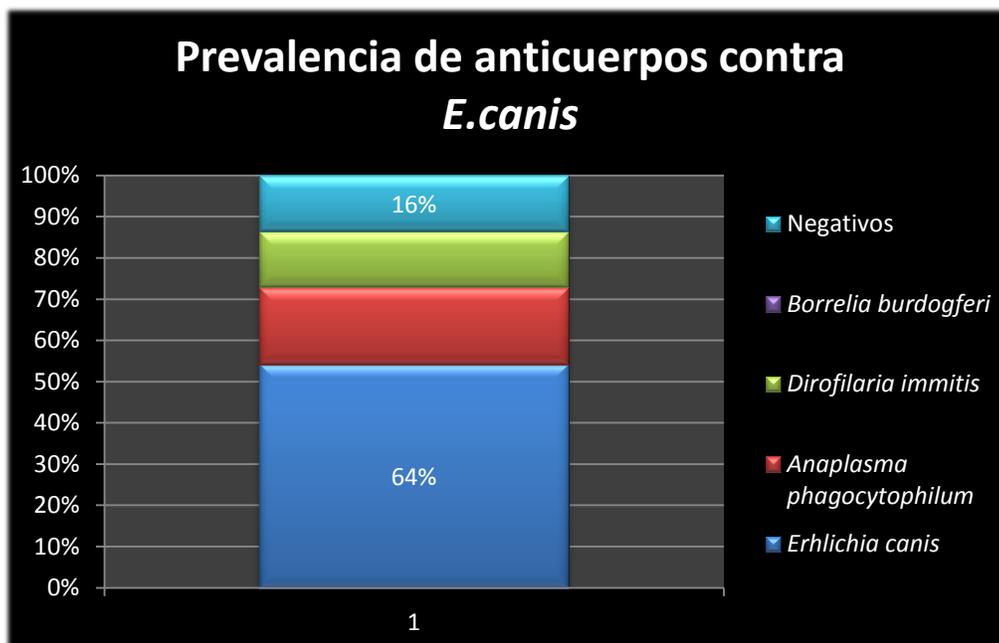
Se observara que la muestra fluya por la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente entre 30 a 60 segundos. Es posible que quede algún resto de la muestra en el pocillo.

6. En cuanto aparezca el color en el círculo de activación, presionar el activador con firmeza hasta que quede al ras con el cuerpo del dispositivo.
7. Leer los resultados de la prueba después de haber transcurrido 8 minutos.

Si la prueba anteriormente descrita se tornaba positiva, se le realizaba un estudio de hemograma convencional para medir los valores de los tres tipos de grupos celulares y poder generar así los datos concernientes a la investigación, dichos datos se registraron en la bitácora y se recopilaron en una computadora en un programa de hoja de cálculo para su procesamiento y análisis.

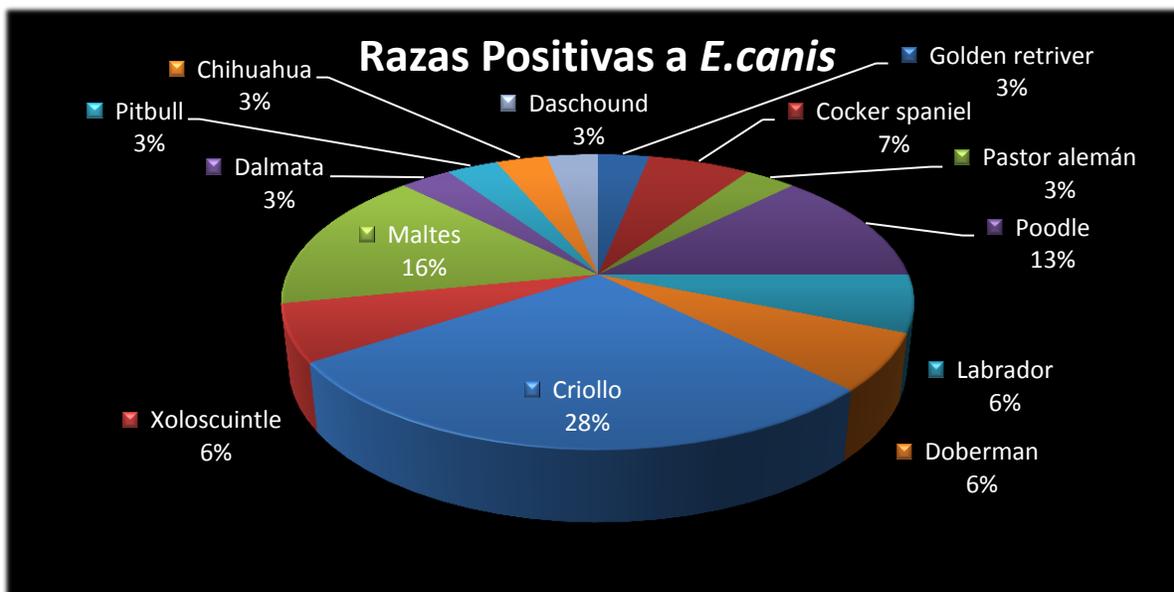
5. RESULTADOS

En el estudio efectuado se observó que la prevalencia de anticuerpos contra *E.canis* en Lázaro Cárdenas Michoacán fue de 64 % (ver gráfica 5.1) (32 de 50 perros), el 16% de los perros muestreados no presentó ninguna reacción positiva a *E.canis* o a alguna de las otras tres enfermedades (*Borrelia burdogferi*, *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma phagocytophilum*), el porcentaje restante (20%) presentó coinfecciones con dichas enfermedades así como presentación única de las mismas.



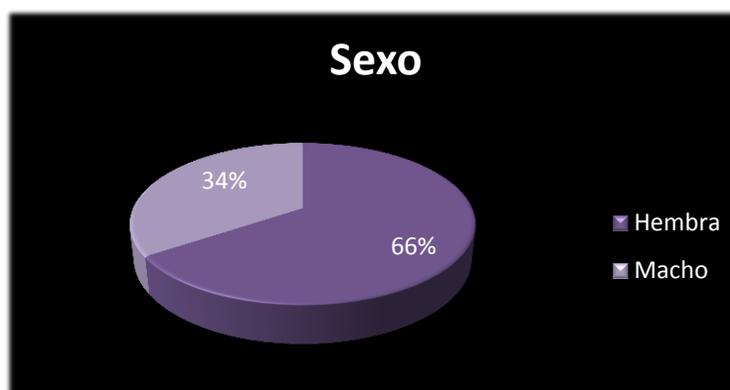
Gráfica 5.1 Prevalencia de anticuerpos contra *E.canis* en perros muestreados en la ciudad de Lázaro Cárdenas Michoacán. (n=50)

La raza que resultó con mayor porcentaje de pacientes caninos positivos a la prueba fue la criolla (ver grafica 5.2).



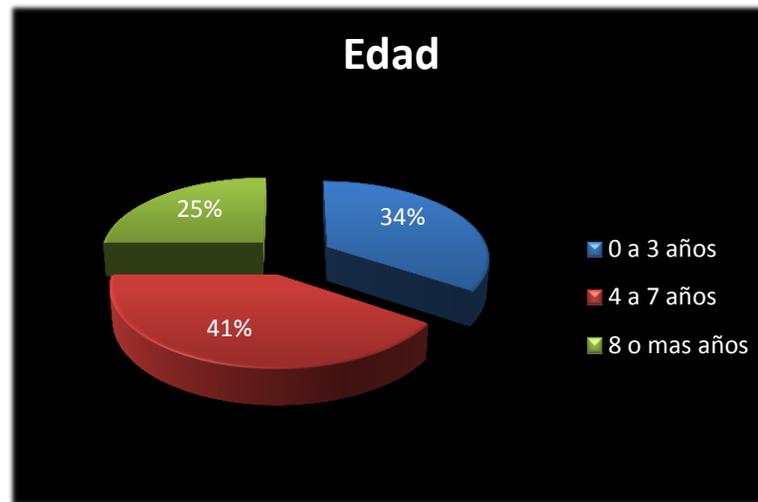
Gráfica 5.2 Razas más afectadas con títulos de anticuerpos contra *E.canis* de perros muestreados en la ciudad de Lázaro Cárdenas Michoacán. (n=32)

El 66 % de los perros positivos a *E.canis* fueron hembras y el 34 % machos (ver gráfica 5.3).



Gráfica 5.3 Predisposición por sexo encontrada en perros con anticuerpos contra a *E.canis* muestreados en la ciudad de Lázaro Cárdenas Michoacán (n=32)

Los perros de acuerdo al rango de edad más afectado fueron los que se encontraban entre 4 a 7 años de edad (gráfica 5.4) con un 41%.



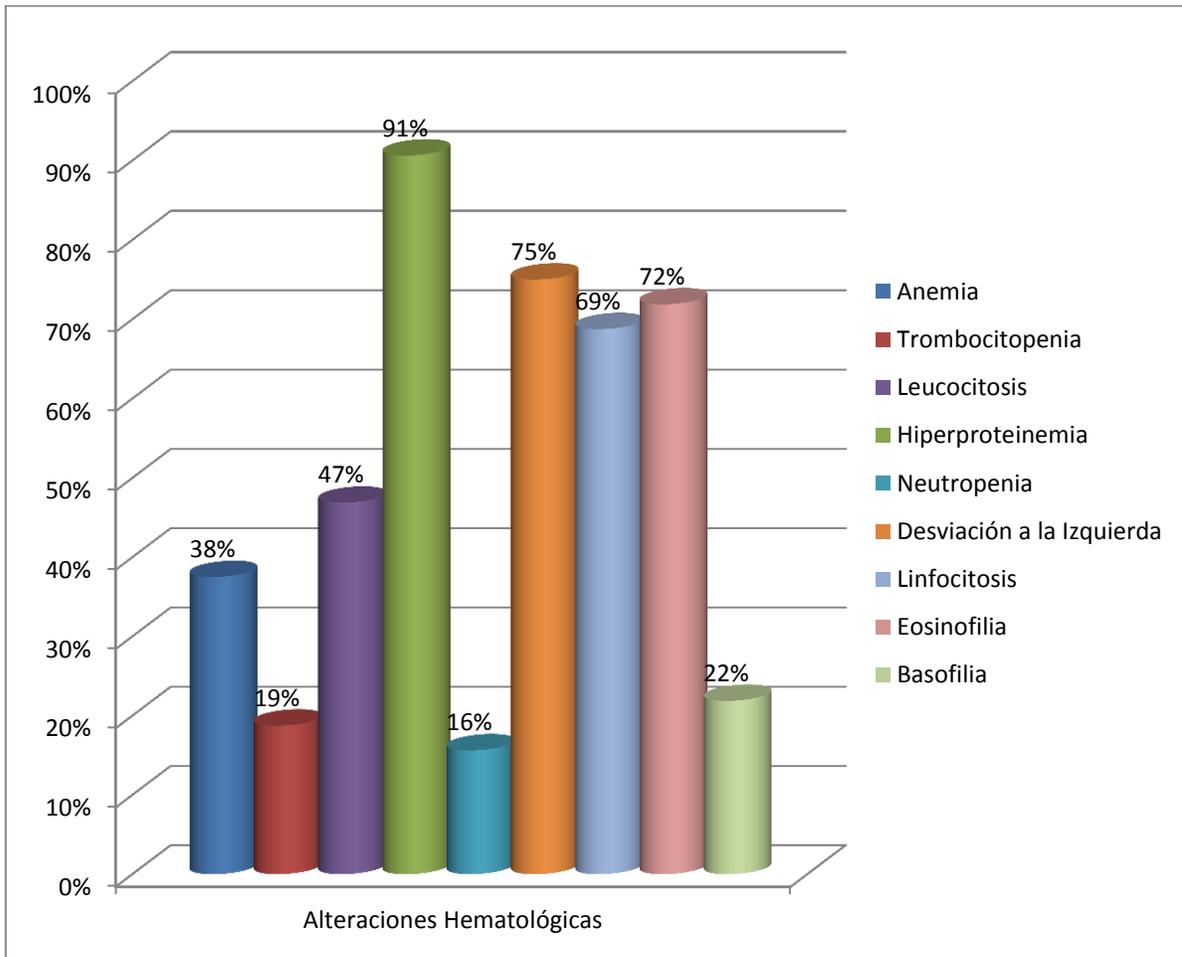
Gráfica 5.4 Rango de edad con mayor prevalencia de anticuerpos contra a *E.canis* de perros muestreados en la ciudad de Lázaro Cárdenas Mihoacán. (n=32)

Se observó que 20 perros positivos a la prueba de ELISA (62%) presentaron infección única de *E.canis*, el 25% presentó coinfección con *Dirofilaria immitis*, y el 13% restante presentó alternancia con infección de *Anaplasma phagocytophilum* y *Dirofilaria immitis*. Esto fue posible determinarse gracias a que el kit de ELISA también detecta anticuerpos y antígenos de estos agentes, dicha prueba también detecta anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* (el agente etiológico de la enfermedad de Lyme) y se obtuvo una prevalencia nula.

El 85% de los perros positivos presentó alguna alteración hematológica en el recuento de leucocitos, hematocrito y plaquetas, solo el 15% de los perros no presentó alteraciones en el recuento general aunque si presentaron alteraciones en los recuentos de linfocitos, eosinófilos, neutrófilos segmentados y en banda. Por lo que se observó que el 100% de los perros positivos a *E.canis* presentaron una o más alteraciones hematológicas.

Ninguno de los 32 perros positivos a *E.canis* presentó pancitopenia, solo el (3%) presentó bicitopenia consistente con trombocitopenia y anemia.

Se observó que 38% de los perros presentaron anemia, el 19 % trombocitopenia, 47% leucocitosis, 91% Hiperproteínea, 16% neutropenia, 75% presentó desviación a la izquierda, 69% presentó linfocitosis, 72% eosinofilia y 22 % presentó basofilia como se muestra en la gráfica 5.5.



Gráfica 5.5 Alteraciones hematológicas más frecuentes en perros con títulos contra *E.canis* muestreados en la ciudad de Lázaro Cárdenas Michoacán (n=32)

También se pudo observar que del 47 % de perros que presentaron leucocitosis, solo el 40% la presentó sin ninguna otra alteración en el hematocrito ni recuento plaquetario, el 33% presentó leucocitosis en combinación con anemia, el 19% presentó leucocitosis con trombocitopenia, y ningún perro presentó pancitopenia como ya se había mencionado.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que el agente etiológico de la enfermedad *Ehrlichia canis* se encuentra ampliamente distribuido como lo refirieron Martin y cols. en el año 2000 y Núñez en el 2003, donde hablan sobre la prevalencia de este agente en el mundo y este último, en México, en dicho estudio la prevalencia fue de 33.1%, y específicamente en el apartado del estado de Michoacán manejó una prevalencia nula, aunque Núñez lo asocia a un bajo muestreo, y refirió en su estudio que las prevalencias podrían variar ampliamente dependiendo de la zona en la que se halla muestreado así como por su ecosistema; es por ello que se puede corroborar con el 64% de prevalencia obtenido en el presente estudio, que aunque ya había sido muestreado por Núñez en 2003, dicho método fue insuficiente para la región de Michoacán, y no selectivo hacia regiones endémicas de la enfermedad en el mismo estado como lo son las zonas cálidas y tropicales donde abunda el vector. Aunque este estudio solo se posicionó en una región específica de la Costa del estado, se contrastó altamente la diferencia en prevalencia entre zonas pertenecientes a la misma región. También se denotó que hay una alta relación con la prevalencia de títulos de anticuerpos contra *E.canis* y la existencia de historial de infestación previa con el vector (la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*) como lo mencionó Johnson y cols. en 1998. Aunque en este estudio no se contabilizó estadísticamente.

Durante los muestreos se corroboró mediante un cuestionamiento verbal y un examen físico que los perros muestreados no presentaran signología clínica de la enfermedad, de lo contrario no eran muestreados, esto porque se deseó estudiar pacientes en fase subclínica, debido al enfoque de relevancia que se le dio al estudio, puesto que la fase clínica de la enfermedad ya ha sido descrita ampliamente como se muestra en la introducción de este trabajo.

Dichos conteos de prevalencia se pueden asociar en gran medida a infecciones con curso subclínico o crónico, pues a pesar de que son pacientes clínicamente sanos

absolutamente el 100% presentó alteraciones hematológicas en el recuento de alguna de sus líneas celulares; aunque en un estudio reportado por Hoskins y cols. en 1988 se detectaron títulos persistentes a ehrlichiosis en perreras saludables con una prevalencia del 20.3%.

Warner y cols. en 1996, refirieron que en los perros no tratados es posible que ingresen a la fase subclínica por lo que no se observa signología y los perros se normalizan clínicamente pero también comentaron que es posible que los niveles de plaquetas permanezcan en niveles inferiores a los rangos de referencia, en este estudio se observó que solo el 19% de los perros positivos a la prueba de ELISA presentaron trombocitopenia. Harrus y cols. en 1998 comentaron que los perros que se encuentran en la fase subclínica pueden ser portadores persistentes en potencia durante años como lo demostraron en su estudio de seguimiento a 3 años, por lo que se valida el hecho de que pacientes que no tenían garrapatas al momento del estudio, presentaban títulos de anticuerpos contra *E.canis* lo que los asocia a pacientes con infección persistente del agente sin signología aparente. Cabe señalar que ninguno de los perros muestreados presentaba signos clínicos de la enfermedad, por lo que se asume que los títulos de anticuerpos que presentaban eran por infección subclínica, crónica, o en su defecto habían resuelto sin tratamiento la enfermedad clínica.

Se puede considerar que aunque las pruebas de ELISA como el Kit Snap 4DX presentan una sensibilidad del 97% resultaron positivas a anticuerpos contra *E.canis* no significa que los individuos porten la bacteria, si se ha asociado altamente los títulos altos con las alteraciones hematológicas a la persistencia de la ehrlichia misma en las células del hospedero como lo reportó Bartsch y cols. en 1996. Aunque mencionaron su dificultad para comprobar su persistencia en el organismo.

En el estudio se observó una mayor prevalencia en perros de sexo hembra y con edad de 4 a 7 años, aunque Nyindo y cols. señalaron en 1991 que no existe predilección de edad ni sexo para la enfermedad; se denotó que la raza que presentó más casos positivos fue la criolla, también Nyindo y cols señalaron en 1991

que hay una susceptibilidad a la raza Pastor alemán de la cual en este estudio no se obtuvo una muestra representativa, cabe señalar que este resultado pudo verse afectado ya que la raza criolla fue la predominante durante el muestreo.

Se pudo observar que las alteraciones hematológicas mas presentadas fueron la hiperproteinemia (91%) la cual Harrus y cols. en 1997 la describieron ampliamente y lo han asociado a que la enfermedad produce gamapatías policlonales y la cual debe diferenciarse de leucemia linfocítica de y mieloma. También los perros muestreados presentaron anemia, neutropenia, trombocitopenia, como lo han descrito Warner y cols. en el año 1999 las cuales las han descrito en todas las fases de la enfermedad; además en el presente estudio se encontró que los perros positivos a anticuerpos contra *E.canis* presentaron leucocitosis, desviación a la izquierda, linfocitosis, eosinofilia, y basofilia lo cual se asocia ampliamente a la persistencia de *E.canis* en los perros como lo mencionaron Willard y cols. pero también se puede asociar a coinfecciones con otras enfermedades como *Anaplasma phagocytophilum*, y sobre todo la eosinofilia a la infestación con *Dirofilaria immitis*, inclusive dichos autores refirieron la asociación de estas alteraciones a la infestación por parásitos como las garrapatas, aunque también se puede asociar a alérgenos o degradación tisular. Además pueden presentarse infecciones oportunistas por otros protozoos, hongos y bacterias como también lo mencionaron Dubey y cols. en el año 2003. Así mismo en este estudio se describe que solo el 40% de los perros positivos presentaron leucocitosis como única alteración, que el 33 % presentó leucocitosis en conjunto con anemia, y 19% leucocitosis con trombocitopenia, lo cual se puede asociar a la infección crónica de la enfermedad y a sus coinfecciones con otros agentes como se mencionó anteriormente.

Greene y cols. en 2008 describieron que los pacientes con infección *E.canis* presentan linfocitosis granular por presencia de gránulos azorófilos, la cual se confunde con leucemia linfocítica bien diferenciada en algunos perros; en el presente trabajo, si se pudo observar en algunos pocos casos este tipo de linfocitos. Murphy y cols. en 1998, mencionaron la posibilidad de realizar el diagnóstico definitivo de la *Ehrlichia canis* por medio de frotis de sangre con la identificación de

mórulas en leucocitos, mencionaron que es más sencillo realizar la identificación de frotis de sangre del lecho capilar del pabellón auricular; aunque en dicho trabajo se realizaron los frotis de sangre de vena cefálica o safena no se pudieron identificar estos hallazgos en los frotis de perros positivos anticuerpos contra *E.canis* debido a que los frotis eran delgados y de sangre periférica como ya se mencionó.

7. CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo se puede concluir que tiene relevancia clínica, ya que proporciona una herramienta muy útil al momento de interpretar análisis de laboratorio como lo es el hemograma en pacientes que han estado expuestos a ectoparásitos endémicos de la región de la costa michoacana como es el caso de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la cual transmite el agente etiológico *E.canis*, sobre todo cuando se trata de pacientes clínicamente sanos, que se les podría realizar por ejemplo dicho estudio de laboratorio preoperatoriamente, en los que lo único que observaríamos durante el examen físico es la infestación por este artrópodo, o que en la historia clínica se nos refiera que ha presentado dicha infestación. Por lo que nos serviría de referencia para observar los valores “normales” que podemos encontrar, sin perdernos tanto en buscar la etiología de dichas alteraciones, es decir, nos proporciona una guía práctica para concluir con diagnóstico certero, de esta manera poder determinar la aplicación de un tratamiento específico, dependiendo de cada paciente y las alteraciones que presente.

Otra cuestión importante es que en la región donde se realizó el estudio, de manera casi nula se envían muestras de sangre para su análisis como el caso de un hemograma o una bioquímica sanguínea, ya que en esta zona, no se tiene acceso a lugares donde se realice de manera cotidiana dicho procedimiento en animales, ni

gente capacitada para realizarlo, y es del interés del sustentante de este trabajo, crear una base de datos útil, practica y de fácil acceso que permita valorar a los pacientes en el ambiente de la región, ya que está bien documentado que los individuos presentan ajustes en los valores hematológicos dependiendo de cada zona, de su entorno, clima, humedad, altitud y de las interacciones que tenga cada uno con dicho medio. Lo que permitiría brindar un servicio completo y de calidad a las mascotas y sus propietarios.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, et al. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* and *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi*, and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 51:2145-2165.
2. Donatein A, Lestoquard F. 1937. State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. Arch Inst Pasteur Alger 15:142-187.
3. Jittapalapong S, Jansawan W. 1993. Preliminary survey on blood parasites of cats in Bangkok District Area. Kasetsart J Nat Sci 27:330-335.
4. Nuñez OL, 2003. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. Revista AMMVEPE 2003; 14(3):83-85
5. Martin ME, Bunnell JE, Dumler JS. 2000. Pathology, immunohistology, and cytokine responses in early phases of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. J Infect Dis 181:374-378.
6. Inokuma H, Beppu T, Okuda M, et al. 2003. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. Vet Parasitol 115:343-348.

7. Johnson EM, Ewing SA, Barker RW, et al. 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: *Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 74:277-288.
8. Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, et al. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 36:937-940.
9. Kidd L, Breitschwerdt EB. 2003. Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compend Cont Educ Pract Vet* 25:742-750.
10. Neer TM. 1995. Unpublished data. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
11. Nyindo MBA, Kakoma I, Hansen R. 1991. Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of the protein immunoblot. *Am J Vet Res* 52:1225-1230.
12. Waner T, Baneth G, Strenger C, et al. 1999. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. *Vet Parasitol* 82:121-128.
13. Waner T, Harrus S, Bark H, et al. 1996. Subclinical canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) in experimentally infected beagle dogs. Abstract # 175. *J Am Coll Vet Intern Med* 10:192.
14. Harrus S, Waner T, Keysary A, et al. 1998d. Investigation of splenic function in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 62:15-27.
15. Ravyn MD, Korenberg EI, Oeding JA, et al. 1999. Monocytic *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia. *Lancet* 353:722-723.
16. Weiser MG, Thrall MA, Fulton R, et al. 1991. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 27:84-88.
17. Waner T, Harrus S, Bark H, et al. 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol* 69:307-317.

18. Brouqui P, Dumler JS. 1997. The immune response to *Ehrlichia chaffeensis*, pp 163-172. In Anderson B, Friedman H, Bendinelli M (eds), Rickettsial infection and immunity. Plenum Press, New York, NY.
19. Harrus S, Waner T, Avidar Y, et al. 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 66:241-249.
20. Van Andel AE, Magnarelli LA, Heimer R, et al. 1998. Development and duration of antibody response against *Ehrlichia equi* in horses. *J Am Vet Med Assoc* 212:1910-1914.
21. Ristic M, Dawson JE, Holland CJ, et al. 1988. Susceptibility of dogs to infection with *E. risticii*, the causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). *Am J Vet Res* 49:1497-1500.
22. Barnwell RE, Rikihisa Y. 1994. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron transferrin. *Infect Immun* 62:4804-4810.
23. Grindem CB, Breitschwerdt EB, Perkins PC, et al. 1999. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 35:56-61.
24. Harrus S, Day MJ, Waner T, et al. 2001a. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol* 83:343-349.
25. Harrus S, Waner T, Bark H, et al. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 37:2745-2749.
26. Harrus S, Ofri R, Aizenberg I, et al. 1998a. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol* 78:155-160.
27. Luckschander N, Kleiter M, Willmann M. 2003. Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*. *Schweiz Arch Tierheilkd* 145:482-485.
28. Gaunt SD, Cortsvet RE, Brennan RE, et al. 1996. Platelet-associated IgG and antibodies to platelet proteins in dogs with *Ehrlichia canis* infection. Abstract #29. *Vet Pathol* 33:557.

29. Harrus S, Waner T, Weiss DJ, et al. 1996. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 51:13-20.
30. Waner T, Harrus S, Weiss DJ, et al. 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 48:177-282.
31. Abeygunawardena IS, Kakoma I, Smith RD. 1990. Pathophysiology of canine ehrlichiosis, pp 79-92. In Williams JC, Kakoma I (ed s), *Ehrlichiosis*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
32. Harrus S, Waner T, Eldor A, et al. 1996. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Rec* 139:290-293.
33. Harrus S, Waner T, Eldor A, et al. 1996. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. Abstract #174. *J Am Coll Vet Intern Med* 10:192.
34. Woody BJ. 1985. Clinicopathologic findings in 135 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. Presented at the Workshop on Diseases Caused by Leucocytic Rickettsiae of Man and Animals. University of Illinois, Champaign-Urbana, IL.
35. Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, et al. 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* 37:2631-2638.
36. Gould DJ, Murphy K, Rudoef H, et al. 2000. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *J Small Anim Pract* 41:263-265.
37. Maretzki CH, Fisher DJ, Greene CE. 1994. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 205:1554-1556.
38. Troy GC, Forrester SD. 1990. Canine ehrlichiosis, pp 404-418. In Greene CE (ed), *Infectious diseases of the dog and cat*, ed 1. WB Saunders, Philadelphia, PA.

39. Meinkoth JH, Ewing SA, Cowell RL, et al. 1998. Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presented with inflammatory central nervous system disease. *J Vet Intern Med* 12:389-393
40. Buoro IBJ, Kanui TI, Atwell RB, et al. 1990. Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. *J Small Anim Pract* 31:624-627.
41. Cowell RL, Tyler RD, Clinkenbeard KD, et al. 1988. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192:1093-1095.
42. Stith DM, Telford SR III, Dawson JE. 1996. Diagnosing ehrlichiosis. *Ann Intern Med* 124:854.
43. Stockham SL, Schmidt DA, Curtis KS, et al. 1992. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res* 53:63-68
44. Cocco R, Sanna G, Cillara MG, et al. 2003. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann NY Acad Sci* 990:126-130.
45. Dubey JP, Pimenta AL, Abboud LC, et al. 2003. Dermatitis in a dog associated with an unidentified *Toxoplasma gondii*-like parasite. *Vet Parasitol* 116:51-59.
46. Dawson JE, Ewing SA. 1992. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *Am J Vet Res* 53:1322-1327.
47. von Stedingk LV, Gurtelschmid M, Hanson HS, et al. 1997. The human granulocytic ehrlichiosis (HE) agent in Swedish ticks. *Clin Microbiol Infect* 3:573-574.
48. Bulla C, Kiomi Takahira R, Pessoa Araujo J Jr, et al. 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet Res* 35:141-146.
49. de Moraes HAS, Dagnone AS, Trapp SM, et al. 2003. Risk factors in the hemogram of dogs seropositive for *Babesia canis* and *Ehrlichia canis*: a hospital population study in south Brazil. *J Vet Intern Med* 17:422-423.
50. Heeb HL, Wilkerson MJ, Chun R, et al. 2003. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 39:379-384

51. Weaver RA, Virella G, Weaver A. 1999. Ehrlichiosis with severe pulmonary manifestations despite early treatment. *South Med J* 92:336-339.
52. Harrus S, Kass PH, Klement E, et al. 1997c. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec* 141:360-363.
53. Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, et al. 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res* 52:1537-1541.
54. Codner EC, Caceci T, Saunders GK, et al. 1992a. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am J Vet Res* 53:2286-2291.
55. Codner EC, Maslin WR. 1992b. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am J Vet Res* 53:294-299.
56. Ramsay AH, Belongia EA, Gale CM, et al. 2002. Outcomes of treated human granulocytic ehrlichiosis cases. *Emerg Infect Dis* 8:398-401.
57. Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, et al. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 79:325-339.
58. Hoskins JD, Breitschwerdt EB, Gaunt SD, et al. 1988. Antibodies to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. *J Vet Intern Med* 2:55-59
59. Bartsch RC, Greene RT. 1996. Post - therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *J Vet Intern Med* 10:271-274.
60. Perez M, Rikihisa Y, Wen B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol* 34:2133-2139.
61. Hegarty BC, Levy MG, Gager RF, et al. 1997. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. *J Vet Diagn Invest* 9:32-38.

62. McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, et al. 1996. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Vet Diagn Invest 8:441-442.
63. Massung RF, Mauel MJ, Owens JH, et al. 2002. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. Emerg Infect Dis 8:467-472.
64. Stuen S, Van De Pol I, Bergström K, et al. 2002. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. J Clin Microbiol 40:3192-3197.
65. Waner T, Leykin I, Shinitsky M, et al. 2000a. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. Vet Immunol Immunopathol 77:145-150.
66. McBride JW, Yu X, Walker DH. 1999. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. Clin Diagn Lab Immunol 6:392-399.
67. Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, et al. 1994. C-reactive protein and 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. J Clin Microbiol 32:912-917.
68. Futch RR, Corstvet RE. 1996. Diagnosis *Ehrlichia canis* infection in dogs using enzyme-linked immunosorbent assays for antibody and antigen. Presented at the Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Little Rock, AR.
69. Bélanger M, Sorenson HL, France MK, et al. 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Clin Microbiol 40:3506-3508.
70. Waner T, Strenger C, Keysary A, et al. 1998. Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. Vet Immunol Immunopathol 66:237-243.
71. Harrus S, Alleman AR, Bark H, et al. 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. Vet Microbiol 86:361-368

72. Greene, C. "Enfermedades infecciosas, perros y gatos" Tercera Edición 2008 Volumen 1. Cap: 28 "Ehrlichiosis, neorickettsiosis, anaplasmosis e infección por Wolbachia" pp.:227-259.
73. Brouqui P, Dumler JS, Raoult D, et al. 1992. Antigenic characterization of Ehrlichiae: protein immunoblotting of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia risticii*. J Clin Microbiol 30:1062-1066.
74. Dawson JE, Biggie KL, Warner CK, et al. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. Am J Vet Res 57:1175-1179.
75. Inokuma H, Nane G, Uechi T, et al. 2001b. Survey of tick infestation and tick-borne ehrlichial infection of dogs in Ishigaki island, Japan. J Vet Med Sci 63:1225-1227.
76. Park BK, Kim MJ, Kim EH, et al. 2003. Identification of trematode cercariae carrying *Neorickettsia risticii* in freshwater stream snails. Ann NY Acad Sci 990:239-247.
77. Maurin M, Bakken JS, Dumler JS. 2003. Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. Antimicrob Agents Chemother 47:413-415.
78. Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, et al. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet Microbiol 91:197-204
79. Iqbal Z, Chaichansiriwithaya W, Rikihisa Y. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J Clin Microbiol 32:1658-1662.
80. Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC. 1994. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. J Clin Microbiol 32:2107-2112.
81. Stiles J. 2000. Canine rickettsial infections. Vet Clin North Am Small Anim Pract 30:1135-1149.
82. Standaert SM, Dawson JE, Schaffner W, et al. 1995. Ehrlichiosis in a golf-oriented retirement community. N Engl J Med 333:420-425.

83. Bakken JS, Haller I, Riddell D, et al. 2002. The serologic response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 34:22-27
84. Harrus S, Kenny M, Miura L, et al. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4488-4490.
85. Iqbal Z, Rikihisa Y. 1994. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *J Clin Microbiol* 32:1644-1649.
86. Wen B, Rikihisa Y, Mott J, et al. 1995. *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. *Int J Sys Bacteriol* 45:250-254.
87. De Castro MB, Machado RZ, Cury LP, et al. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol* 119:73-86.
88. Greene CE, Harvey JW. 1984. Canine ehrlichiosis, pp 545-561. In Greene CE (ed), *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat*. WB Saunders, Philadelphia, PA.
89. Lockhart JM, Davidson WR, Stallknecht DE, et al. 1997. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. *J Clin Microbiol* 35:1681-1686.
90. Trapp SM, Dagnone AS, Vidotto O, et al. 2002. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in South Brazil. *J Vet Intern Med* 16:365.
91. Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, et al. 1995. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 172:1007-1012.
92. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1997. Doxycycline treatment and challenge infection with two *Ehrlichia canis* strains. Abstract # 116. *J Vet Intern Med* 11:133.

93. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1998a. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42:362-368.
94. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, et al. 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *J Vet Intern Med* 16:309-315
95. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, et al. 1998c. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol* 36:2140-2142.
96. McBride JW, Corstvet RE, Breitschwerdt EB, et al. 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *J Clin Microbiol* 39:315-322
97. Kikvi GM, Mitema ES, Buoro IBJ. 2001. The pharmacokinetics of a long-acting oxytetracycline formulation in healthy dogs and in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Comm* 25:391-400.
98. Brouqui P, Raoult D. 1990. In vitro susceptibility of *Ehrlichia sennetsu* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1593-1596.
99. Breitschwerdt EB, Davidson MG, Aucoin DP, et al. 1991. Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 35:2375-2381.
100. Brouqui P, Raoult D. 1992. In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans. *Ehrlichia chaffeensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:2799-2803.
101. Klein MB, Nelson CM, Goodman JL. 1997. Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: promising activity of quinolones and rifamycins. *Antimicrob Agents Chemother* 41:76-79.
102. Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, et al. 1996. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J Clin Microbiol* 34:434-435.
103. Kontos VI, Athanasiou LV. 1998. Use of enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis. *Canine Pract* 23:10-14.

104. Matthewman LA, Kelly PJ, Wray K, et al. 1996. Antibodies in cat sera from southern Africa react with antigens of *Ehrlichia canis*. Vet Rec 138:364-365.
105. Matthewman LA, Kelly PJ, Bobade PA, et al. 1993. Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. Vet Rec 133:344-346.
106. Kelly PJ, Matthewman LA, Brouqui P, et al. 1998. Lack of susceptibility of *Ehrlichia canis* to imidocarb dipropionate in vitro. J S Afr Vet Assoc 69:55-56
107. Sainz A, Kim CH, Tesouro MA, et al. 2000a. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia* species in dogs in Spain. Ann NY Acad Sci 916:635-642.
108. Kleiter M, Luckschander N, Willmann M, et al. 2001. Imidocarb dipropionate alone or in combination with immunosuppressive therapy for treatment of canine ehrlichiosis, pp 162-163. Proceedings of the 11th Congress of the European Society Veterinary Internal Medicine, Dublin, Ireland.
109. Aroch I, Harrus S. 2001. The use of hematopoietic growth factors: recombinant human granulocyte colony stimulating factor and recombinant human erythropoietin in severe pancytopenia due to canine monocytic ehrlichiosis. Israel J Vet Med 56:65-69.
110. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1998b. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol 36:2645-2651.
111. Davoust B, Marie JL, Mercier S, et al. 2003. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. Vet Parasitol 28:91-100.
112. Shaw SE, Kenny MJ, Lerga AI, et al. 2001d. A PCR-based survey of tick-borne infections in Danish cats and dogs. Proceedings of the 18th Conference World Association of Advancement of Veterinary Parasitology, Stresa, Italy.
113. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, et al. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 29:2838-2842.
114. Santarém VA, Laposy CB, Farias MR. 2000. *Ehrlichia platys*-like inclusions and morulae in platelets of a cat (abstract). Brazilian J Vet Sci 7:130
115. Stafford, KC, Massung RF, Magnarelli LA, et al. 1999. Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, Lyme disease, and babesiosis in wild white-

- footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut. *J Clin Microbiol* 37:2887-2892.
116. Unver A, Ohashi N, Tajima T, et al. 2001b. Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of *Ehrlichia canis* in dogs, ticks, and cell culture at different temperatures. *Infect Immun* 69:6172-6178.
 117. Liddell AM, Sumner JW, Paddock CD, et al. 2002. Reinfection with *Ehrlichia chaffeensis* in a liver transplant recipient. *Clin Infect Dis* 34:1644-1647.
 118. McBride JW, Yu XJ, Walker DH. 2000. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Infect Immun* 68:13-18.
 119. Rosenfeld-Aguero ME, Horowitz HW, Wormser GP, et al. 1996. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann Intern Med* 125:904-908.
 120. Sadikot R, Shaver MJ, Reeves WB. 1999. *Ehrlichia chaffeensis* in a renal transplant recipient. *Am J Nephrol* 19:674-676.
 121. Talbot TR, Comer JA, Bloch KC. 2003. *Ehrlichia chaffeensis* infections among HIV-infected patients in a human monocytic ehrlichiosis-endemic area. *Emerg Infect Dis* 9:1123-1127.
 122. Engvall EO, Pettersson B, Persson M, et al. 1996. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic Ehrlichia species in dogs, horses, and cattle. *J Clin Microbiol* 34:2170-2174.
 123. Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, et al. 1995. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 172:1007-1012.
 124. Gobierno del Estado de Michoacán "Mapa del Estado", [en línea]. 2008-2011, [04 de Octubre de 2011]. Disponible en la Web: <http://www.michoacan.gob.mx/>
 125. INEGI "Estadística, Censos y Conteos de Población y Vivienda, Censo de Población y Vivienda 2010, Consulta", [en línea]. 2011, [04 de Octubre de 2011]. Disponible en la Web: http://www.inegi.org.mx/sistemas/consulta_resultados/iter2010.aspx?c=27329&s=est

126. Parrado, M. Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneo en caninos con sintomatología compatible con ehrlichiosis
En: Revista Orinoquía [en línea]. (2003).
<http://orinoquia.unillanos.edu.co/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=17> [20 de septiembre en 2011]
127. Royal. "What is Ehrlichiosis?" Consulta [en línea]. 9 de Junio 2009. [4 de Octubre de 2011] Disponible en:
<http://thelifeofroyal.blogspot.com/2010/06/what-is-ehrlichiosis.html>
128. Willard M., Tvedten H. 2004 "Transtornos leucocitarios" Diagnóstico clinicopatológico práctico en los pequeños animales. p.64-93