

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**Seroprevalencia y Rastreo de Animales Sospechosos a *Ehrlichia canis*,  
en Perros Atendidos en Clínicas Veterinarias de la Ciudad de Mexicali,  
Baja California, México.**

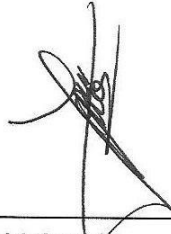
**TESIS**  
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA:**  
**MVZ. ANA PAULINA HARO ALVAREZ**

**MEXICALI, B.C., MÉXICO**

**OCTUBRE DEL 2007**

**Seroprevalencia y Rastreo de Animales Sospechosos a *Ehrlichia canis*, en Perros Atendidos en Clínicas Veterinarias de la Ciudad de Mexicali, Baja California, México. Tesis presentada por Ana Paulina Haro Álvarez como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:**



---

MC. Gilberto López Valencia  
Director



---

MC. Luis Tinoco Gracia  
Codirector



---

Dr. Tomas Benjamín Rentería Evangelista  
Asesor



---

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto  
Asesor

---

Mexicali, Baja California México a 23 de Agosto de 2007  
Lugar y Fecha

## AGRADECIMIENTOS

A Gilberto López que además de ser el director de tesis es un amigo de quien siempre he recibido apoyo y consejos que me han permitido seguir adelante y quien me ha enseñado que el conocimiento no tiene ningún valor si no va de la mano con la calidad humana. A Tomás Rentería, a quien respeto y admiro por su disposición en todo momento para apoyar a los que tienen sed de conocimiento. Luis Tinoco una persona siempre preocupada y ocupada por lograr la dignificación del gremio, quien me invitó a participar en su proyecto de investigación e incursionar en la investigación científica. A Gerardo Medina quien siempre estuvo dispuesto a brindar su ayuda y aportar con sus conocimientos para beneficio de este proyecto, a Eduardo Sánchez el apoyo brindado en todo momento sin el cual no hubiera sido imposible culminar estos estudios a él y a mi *Alma Mater* la Universidad Autónoma de Baja California por la confianza depositada en mí para realizar entrenamientos que me ayudaron a tener una formación integral, así como a todos los maestros que están y quien ya no está que estuvieron involucradas en mi formación y en el desarrollo de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A mis padres de quienes siempre he recibido el apoyo para seguir adelante en mis estudios.

## CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	Vi
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	2
Etiología .....	2
Morfología .....	4
Patogenia .....	6
Signos clínicos .....	8
<i>Fase aguda</i> .....	8
<i>Fase subclínica</i> .....	10
<i>Fase crónica</i> .....	10
<i>Manifestaciones cutáneas</i> .....	12
<i>Signos oculares</i> .....	12
<i>Invasión del sistema nervioso central</i> .....	14
<i>Polineuropatías</i> .....	15
Respuesta del sistema inmune .....	15
Evasión del sistema inmune .....	16
Epidemiología .....	18
Prevalencias históricas .....	20
Diagnóstico .....	21
<i>Medición de plaquetas</i> .....	21
<i>Hemograma</i> .....	22
<i>Química sanguínea</i> .....	23
<i>Búsqueda de la mórula</i> .....	23
<i>Examen microscópico directo de sangre periférica</i> .....	24
<i>Examen microscópico de frotis de capa flogística</i> .....	24
<i>Examen microscópico de Punción con aguja delgada a linfonodo</i> .....	24

<i>Examen microscópico de medula ósea / bazo</i> .....	24
<i>Cultivo</i> .....	28
<i>Serología</i> .....	28
Inmunofluorescencia Indirecta (IFA) .....	29
Inmunoabsorbencia unida a enzima (ELISA) .....	30
Western Blot .....	30
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i> .....	31
Tratamiento .....	33
<i>Tetraciclinas</i> .....	33
<i>Doxiciclina Hicyclato</i> .....	35
<i>Rifampicina</i> .....	36
<i>Cloranfenicol</i> .....	36
<i>Enrofloxaxina</i> .....	36
<i>Dipropionato de Imidocarb</i> .....	37
<i>Glucocorticoides</i> .....	37
Prevenición y control .....	37
<i>Medicamentos desparasitantes</i> .....	38
Fipronil .....	38
Quimioprevención .....	38
Vacunación .....	39
Coinfección .....	40
Potencial zoonótico .....	41
<i>Ehrlichia chaffenesis</i> .....	42
LITERATURA CITADA .....	44
EXPERIMENTO I .....	52
Abstract .....	53
Introduction .....	54
Materials and Methods .....	54
Results and Discussion .....	58
Conclusions .....	60
References .....	60

## LISTA DE CUADROS

### Revisión de Literatura

	Pág.
Cuadro 1. Especies de <i>Ehrlichia</i> clasificadas según línea celular que infecta .....	5
Cuadro 2. Terapia antimicrobiana contra <i>E. canis</i> .....	34

### Experimento I

Table 1. Results for CME using the ELISA test in dogs attended in 38 veterinary clinics in the city of Mexicali .....	65
Table 3. Results from the follow-up of patients suspected of carrying Canine Monocytic Erlichiosis according to ELISA test (n = 15) .....	66
Table 4. Odds ratio (OR) between the season, and positive samples to CME .....	67

## LISTA DE FIGURAS

### Revisión de literatura

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Clasificación Taxonómica .....	3
Figura 2. Inclusión de <i>E. canis</i> en un monocito cultivado .....	8
Figura 3. Mordedura de garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i> con equimosis marcadas en un paciente con la enfermedad de EMC ...	10
Figura 4. Epistaxis, signo clínico común en pacientes cursando la etapa crónica de la enfermedad .....	12
Figura 5. Hallazgos a la necropsia de paciente con infección por <i>Ehrlichia canis</i> .....	14
Figura 6. Garrapata <i>Rhipicephalus sanguíneus</i> .....	20
Figura 7. Barrido de capa flogística en sangre periférica .....	26
Figura 8. PAD Ganglio linfático en un paciente con linfadenomegalia y signos de infección por ehrlichiosis canina .....	27
Figura 8. Aplasia médula encontrada en un paciente con erliquiosis monocítica crónica .....	28

## INTRODUCCION

La Erliquiosis monocítica canina (EMC) o Pancitopenia tropical canina es una enfermedad zoonótica (Pérez. 1996) transmitida la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* que tiene distribución mundial y es causada por la proteobacteria gram negativa quien es un parásito intracelular obligado de los monocitos *Ehrlichia canis* (Green, 1998). La enfermedad fue descrita por primera vez en Argelia en 1935 por Donatien y Lestoquard, desde entonces ha sido reconocida mundialmente como causante de enfermedad de importancia en la familia de los canídeos (Green 2006). Se caracteriza por desarrollarse en tres fases denominadas aguda, subclínica y crónica, en cada una suceden diferentes eventos que resultan en un rango amplio de manifestaciones clínicas, que pueden ir desde una enfermedad clínicamente inaparente hasta provocar un padecimiento fatal (Preziosi y Cohn, 2002). Para su diagnóstico se han utilizado diferentes métodos, como la inmunofluorescencia directa (IFA), inmunoabsorbencia unida a enzimas (ELISA), y recientemente el uso de la biología molecular como herramienta específica para su detección (Harrus et al., 1997). Esta bacteria es susceptible a antibióticos como tetraciclinas y sus derivados sintéticos doxiciclina y minociclina entre otros, por lo que es posible la eliminación de la bacteria del organismo infectado. La prevención de nuevas infestaciones de garrapatas por medio de fumigaciones periódicas para el control del vector forma parte del manejo médico que tiene como fin evitar su transmisión o reinfección. La EMC presenta mayores prevalencias en climas cálidos o ambientes que favorezcan la reproducción del agente transmisor, como es el caso del noroeste de México (Tinoco-Gracia et al., 2007). En la región se ha logrado evidencia serológica de *E. canis* (Tinoco-Gracia et al, 2007). Sin embargo se desconoce la seroprevalencia de EMC en esta región.

**El objetivo de este estudio es estimar la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y realizar un rastreo de pacientes sospechosos a la enfermedad de EMC en la ciudad de Mexicali.**

## REVISION DE LITERATURA

### ***Etiología***

La Erliquiosis monocítica canina (EMC) es causada por una bacteria del orden de los *Rickettsiales* que son parásitos del intestino de algunos artrópodos como garrapatas, piojos, pulgas, y son transmitidas a diversos mamíferos. Son patógenos causantes de enfermedades zoonóticas que se diseminan por sangre hacia otros órganos (Bernabeu y Segura-Porta, 2005). Todas las especies de la familia de las *Rickettsias* son bacterias intracelulares obligadas que crecen libremente en el citoplasma de las células de su hospedador eucariota. Se clasifican en el orden de los *Rickettsiales* pertenecen a la familia *Rickettsiaceae*, Tribu *erlichieae*, que contiene a bacterias que son parásitos intracelulares obligados con tropismo para los leucocitos y comprende tres géneros: *Ehrlichia*, *Cowdria* y *Neorickettsia* (Figura1) Rikihisa, 1991.

El género *Ehrlichia* fue nombrado en 1945 en honor a Paul Ehrlich (Beeching et al., 2000). Existen varias especies de Erliquias que pueden infectar al perro siendo *E. canis* la causante de la enfermedad en estudio que fue informada por primera vez como una entidad clínica distinta en el país de Argelia en 1935 por Donatien y Lestoquard, desde entonces ha sido informada mundialmente como causante de enfermedad, y como agente infeccioso de importancia en la familia de los cánidos que puede llegar a infectar a humanos y felinos. (Dumler et al., 2001; Preziosi y Cohn, 2002; Skotarczak, 2003).

Todos los miembros del género *Ehrlichia* con excepción de *E. canis* tienen distribución geográfica limitada así también afectan especies específicas

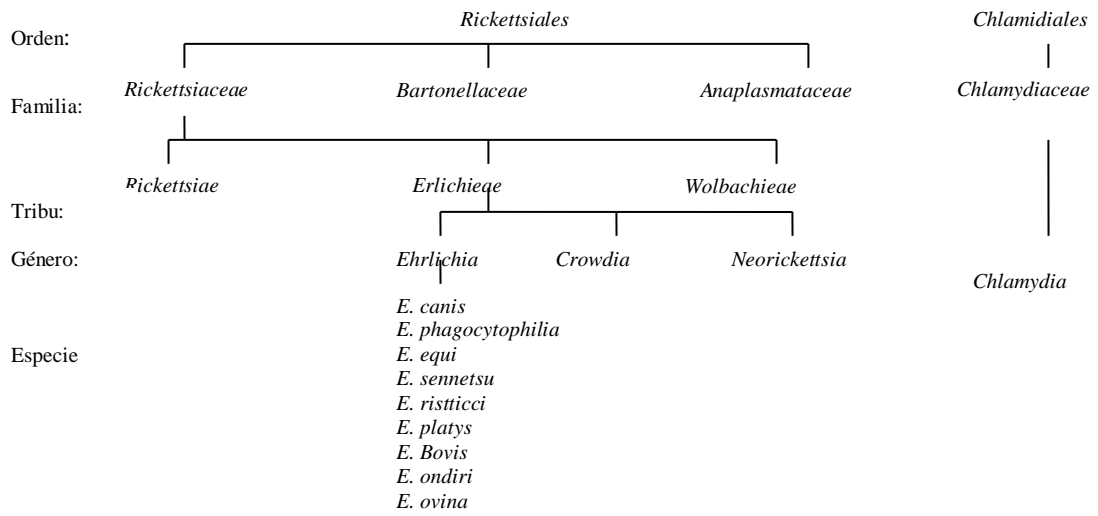


Figura1. Clasificación Taxonómica , adaptado de Rikihisa (1991).

de hospedadores en la naturaleza. Estas especies infectan perros, caballos, rumiantes y humanos. Dependiendo de la especie, los miembros de la tribu pueden infectar monocitos circulantes, granulocitos, linfocitos o plaquetas y pueden ser transmitidos a través de sangre aislada (Cuadro 1). Las especies que infectan granulocitos y plaquetas pueden ser vistas fácilmente en estas células en estadios agudos. En el caso de las especies de *Ehrlichia* que afectan la línea monocítica es menos frecuente encontrarlas en sangre debido a que la infección en monocitos es baja. Ninguna de las pertenecientes a esta tribu ha sido cultivada fuera de las células eucariotas o saco vitelino. (Rikihisa, 1991).

### ***Morfología y ultraestructura:***

Las *rickettsias* son proteobacterias que miden 0.3µm de ancho y 0.5 µm de largo, son parásitos intracelulares obligados muy pequeños visibles al microscopio simple, pequeños cocos gram negativos que se tiñen de azul oscuro con tinción Romanowsky, de un rojo débil con el método de Maquiavelo y de café a negro con la tinción de plata. Estas bacterias no sobreviven mucho tiempo fuera del hospedador, lo que explica el porque son transmitidas de animal a animal o a través de un artrópodo (Madigan et a.,1995). El organismo se encuentra en vacuolas delimitadas por una membrana que tienden a ocupar un lado dentro del citoplasma de la célula eucariota infectada principalmente leucocitos, estas vacuolas no se fusionan con lisosomas siendo este proceso mas bien restringido a vesículas que contienen *Ehrliquia* spp. La densidad electrónica del organismo es similar al fondo citoplasmático de la célula del hospedador, y su escaso contraste hace difícil encontrar células infectadas en tejidos. En cultivos de células de la línea monocítica, *E. canis* es vista principalmente como una densa mórula empaquetada que a veces contiene más de 100 organismos por vacuola. Los organismos individuales difícilmente pueden ser perceptibles en la mórula por medio de microscopios de

**Cuadro 1. Especies de *Ehrlichia* clasificadas según línea celular que infecta**

Línea	Especies	Enfermedad	Leucocitos Infctados	Hospedador natural
<b>Monocítica</b>	<i>E. canis</i>	Erliquiosis monocítica canina	Monocitos, macrfagos, linfocitos?	Caninos
	<i>E. chaffeensis</i>	Erliquiosis monocítica humana	Mononucleares, neutrófilos , linfocitos	Humanos, perros, venado
		Erliquiosis humana venezolana	Mononuclear	Humanos , perros?
	( <i>E. canis</i> )	Erliquiosis venezolana	Monocitos , macrfagos	Humanos, perror, lemurs en cutiverio
	<i>Crowdia. ruminatum</i>	Heartwater	Endoteliales, monocitos y neurofilos	Bovinos, ovejas, cabras,perros
<b>Granulocítica</b>	<i>E. ewingi</i>	Erliquiosis granulocítica canina	Neutrófilos y eosinófilos	Perros,
	<i>E. equi</i>	Erliquiosis granulocítica equina	Neutrófilos y eosinófilos	Humanos,perros, gatos,, cabras y ovejas caballos
		Erliquiosis monocítica humana	Neutrófilos	Humanos, caballos, perros, ratonas pata blancas.
	<i>E. phagocytophilia</i>	Fiebre piquete de garrapata	Neutrófilos, eosinófilos,	Ovejas, bovinos

Adaptado de Green (2006)

luz debido a su empaquetamiento (Rikihisa,1991). Las inclusiones consisten en vacuolas delimitadas por membrana que contienen cuerpos elementales de redondos a ovoides, la mayoría de estos cuerpos elementales miden 0.5 a 0.9  $\mu\text{m}$  de diámetro y el número de ellos va de 2 hasta 40 por célula, estos se encuentran unidos por 2 distintas membranas de tres capas. La pared celular, tiende a encontrarse y a ondularse, y la membrana interna aparece fusionada a los constituyentes de la partícula. Las estructuras internas de la partícula aparecen como áreas pálidas, las áreas más densas constituyen gránulos sugestivos a ribosomas (Hildebrant et al.,1973) Figura 2. Contienen citocromos y sus reacciones metabólicas son aerobias, se multiplican por fisión binaria simple, poseen DNA y RNA, son susceptibles a antibióticos y tienen una pared celular inusual que le permite establecer infecciones persistentes. Solamente pueden oxidar el ácido glutámico o la glutamina, aunque *Ehrliquia spp* prefiere utilizar glutamina en vez de glutamato debido a que se encuentran envuelta en una membrana en la cual la glutamina penetra mejor los fagosomas que el glutamato (Rikihisa, 1991).

### ***Patogenia***

El principal vector es la garrapata *Rhipicephalus sanguíneus*. Aunque recientemente se ha demostrado por medio de experimentos que *Dermacentor variabilis* es también capaz de transmitirla (Harrus et al., 1997; Skotarczack, 2003). La infección se inicia en el sitio de inoculación, y posteriormente se extiende célula por célula y viaja por circulación venosa lo cual produce un cúmulo de numerosos focos y una vasculítis sistémica de vasos pequeños por la infección directa de las células endoteliales, que originan un infiltrado linfocitario perivascular e inducen su propia fagocitosis. Proliferan por fisión binaria simple, siendo finalmente expulsadas por exocitosis para seguir infectando células contiguas. (Bernabeu y Segura-Porta; 2005).

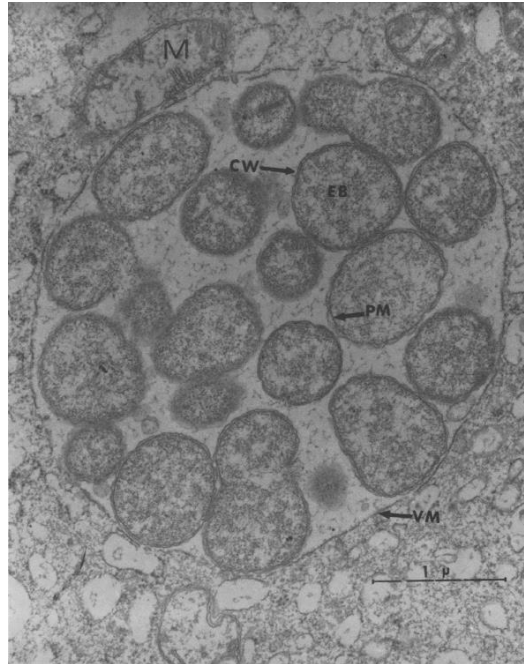


Figura 2. Inclusión de *E. canis* en un monocito cultivado.

Se observan numerosos cuerpos primarios (EB) con distintas membranas plasmáticas (PM) pared celular externa ondulada (CW), las formas irregulares indican una división temprana, así como son evidentes partículas pequeñas sin membranas distinguibles, la membrana de la vacuola (VM) y la mitocondria (M) están señaladas, Hildebrant et al., (1973).

## ***Signos clínicos***

Los signos dependerán de la fase de enfermedad que se encuentre cursando el animal así como la región geográfica donde se localice. Según estudios realizados donde fue estudiada la respuesta inmune humoral mediante electroforesis, IFA, ELISA y western blot se encontró que *E. canis* reacciona en una variedad amplia de proteínas en un rango que va de 20 a 60 Kda. Las reacciones inmunológicas más fuertes fueron encontradas en el rango de 27 a 30 kDa, cuando estos fueron comparados con estudios internacionales y se llegó a la conclusión que existe una heterogenicidad antigénica entre los organismos de *E. canis* alrededor del mundo. Esta diversidad puede ser una de las razones de la variedad en las manifestaciones clínicas de EMC en las diferentes regiones geográficas (Harrus et al., 1999).

**Fase aguda:** Inicia después de 8 a 20 días después de la mordedura por una garrapata infectada, dura aproximadamente de 2 a 4 semanas (Skotarczak, 2003). El parásito entra al torrente sanguíneo y sistema linfático localizando las células del sistema fagocítico mononuclear del bazo, hígado y nódulos linfáticos donde comienza su replicación. (Harrus et al., 1997). Invade los leucocitos y se divide para formar mórulas. Se manifiesta con signos ligeros y no específicos como fiebre, depresión, disnea, anorexia y una ligera pérdida de peso. (Harrus et al., 1997; Preziosi y Cohon, 2002; Skotarczak, 2003). Durante esta fase el hallazgo hematológico más consistente es el desarrollo de trombocitopenia que va de media a severa (Bulla et al., 2004). El mecanismo que desarrolla la patogenia de trombocitopenia en esta etapa incluye el incremento en el consumo debido a cambios inflamatorios en el endotelio del vaso sanguíneo, aumento del secuestro de plaquetas y su destrucción por el sistema inmune o por daño debido a la disminución del tiempo de supervivencia de la célula (que va de 2 a 4 días cuando la media es 4 a 9). En esta fase ha sido demostrada de manera experimental la presencia de anticuerpos antiplaquetarios (APA) mediante su detección a partir de los 7 días postinfección, aparecen antes de



Figura 3. Mordedura de garrapata *Rhipicephalus sanguineus* demostrando al mismo tiempo equimosis marcadas en un paciente con la enfermedad de EMC.  
Fotografía por: Paulina Haro

los anticuerpos contra *E. canis* lo que sugiere que las células B acarrean receptores autoanticuerpo que son inducidos mediante la proliferación y maduración e interacción con los antígenos de erliquia los cuales son genéticamente similares. La otra teoría propuesta es que los APA se desarrollan de manera secundaria cuando el sistema inmune detecta y reacciona contra las proteínas estructurales liberadas tras la destrucción masiva de plaquetas. En fase aguda, la infección por *E. canis* puede tener recuperación espontánea o persistir después de una recuperación clínica o tratamiento no efectivo (Harrus et al.,1999).

**Fase subclínica:** esta fase inicia a partir de los días 40 a 120 y se caracteriza por la persistencia del organismo en el hospedador con ausencia de enfermedad clínica. Al parecer el organismo es retenido en pequeño número en las células mononucleares. La duración de esta fase varía, puede ir de semanas a años. El peso del animal se normaliza, la pirexia se resuelve y el paciente aparenta ser clínicamente normal (Green, 1998). En infecciones experimentales, perros con EMC muestran una reducción significativa del conteo leucocitario (comparándolo con los valores preinfección) y presentan una reducción de la cuenta de neutrófilos absoluta. Pero de algún modo, no presentan una leucopenia o neutropenia absoluta. Los pacientes inmunocompetentes deberán de ser capaces de eliminar *E. canis* de lo contrario permanecerán en esta etapa hasta desarrollar la fase crónica (Harrus et al., 1997; Preziosi y Cohon, 2002).

**Fase crónica:** la patogénesis de este estadio es poco comprendida. No todos los animales progresan hasta esta etapa y los factores que lo influncian



Figura 4. Epistaxis signo clínico común en pacientes cursando la etapa crónica de la enfermedad.

aún son desconocidos. La persistencia de la infección por *E. canis* resulta en la formación persistente de anticuerpos tanto específicos como no específicos. (Harrus et al., 2002). La infección causa hipoplasia de la médula ósea por lo cual los perros muestran con frecuencia pancitopenia lo que complica su estado clínico y se considera también como la razón de la trombocitopenia en esta fase. Al mismo tiempo ocurre una disfunción plaquetaria que provoca que la adhesividad de plaquetas se encuentre disminuida y en conjunto con la trombocitopenia contribuyen a las tendencias de sangrados en estos pacientes, los niveles de APA han disminuido por lo que no intervienen en la disfunción plaquetaria. La hiperglobulinemia es más pronunciada, por lo que puede ser visto el síndrome de hiperviscosidad por trombopatías. La glomerulonefritis es el resultado de los depósitos de complejos antígeno anticuerpo resultando en un daño inflamatorio, hay presencia de anemia debido a inflamación crónica, las infecciones concurrentes pueden hacerse presentes atribuyéndose al efecto inmunosupresor de la infección crónica (Harrus et al., 1999; Preziosi y Cohon, 2002). La muerte puede ocurrir como consecuencia de hemorragias y/o infecciones secundarias (Harrus et al., 2002).

**Manifestaciones cutáneas:** Bajo condiciones particulares, como lo es la alteración de los mecanismos de defensa naturales o como resultado de factores como enfermedades concurrentes, la infección en piel puede ocurrir. Existe una asociación aparente entre piodermas profundos recurrentes en pastores alemanes y la presencia de EMC, estos presentan lesiones como eritema localizado, máculas y pústulas. Una deficiencia en la inmunidad mediada por células parece ser que el factor clave que predispone a presentar piodermas recurrentes en esta enfermedad (Cerundolo et al., 1998).

**Signos oculares:** Basado en investigaciones recientes se observó que solo la infección con *E. canis* causa lesiones oculares así como meningitis, comparada con infecciones causadas por bacterias del mismo género como

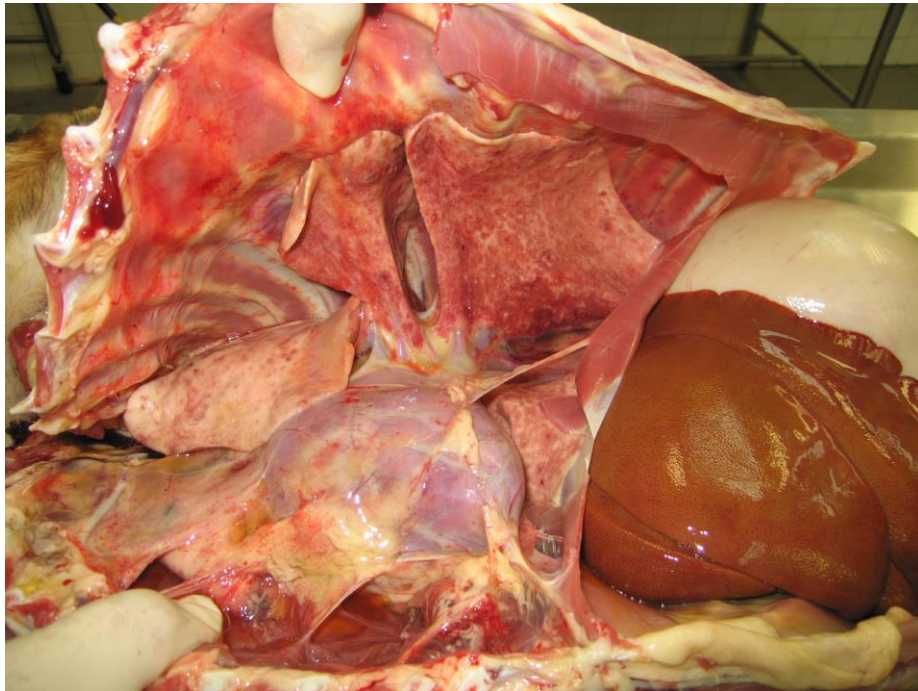


Figura 5. Hallazgos a la necropsia de paciente con infección por *Ehrlichia canis*. Evidencia de las múltiples lesiones por hemorragias y trombosis en tejido pulmonar. Fotografía por: Paulina Haro

*E. ewingii*, *E. chaffeensis* y el agente causal de la Erliquiosis granulocítica humana (EGH). Estos hallazgos pueden ser frecuentes tanto en la fase aguda como en la subclínica donde típicamente se observa involucrado el iris, retina y coroides, siendo en esta última en la que se presenta el daño más intenso (Pancieria et al., 2001).

**Invasión del sistema nervioso central:** Considerando que las células monocíticas tienen una enorme habilidad para migrar a través de la barrera hematoencefálica en condiciones de infección constante. Ha sido documentada de manera experimental que perros infectados con *E. canis* desarrollan de manera frecuente meningitis con gliosis del parénquima. El parasitismo por *rickettsias* en células endoteliales induce a una numerosa serie de eventos que incluyen la inhibición de la apoptosis, expresión de citocinas proinflamatorias y quimioquinas, disminución en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión y estrés oxidativo, que en conjunto conllevan a alterar las propiedades hemostáticas y contribuyen a la formación de las lesiones patológicas. (Douglas et al., 2004).

Las manifestaciones clínicas en humanos con infecciones causadas por *E. chaffeensis* que es un organismo con relación cercana a *E. canis* son mialgia, malestar y dolor de cabeza, el cual es el síntoma principal que refiere al involucramiento de SNC y ha sido encontrado en un 80% de los pacientes. En revisiones de casos de pacientes con un involucramiento severo del sistema nervioso central por *E. chaffeensis* se encontró rigidez nuchal, confusión, ataxia, hiperreflexia, convulsiones, fotofobia y parálisis de nervios craneales, estudios histológicos han confirmado la invasividad a las células endoteliales vasculares en cerebros humanos y ratones infectados experimentalmente. Las lesiones características encontradas en infecciones por rickettsias han sido nombradas como nódulos tífus, los cuales son lesiones vasculares proliferativas similares a las que han sido encontradas en la periferia. Otros hallazgos frecuentes incluyen las acumulaciones perivasculares de células mononucleares y

microinfartos, las cuales se convierten en los hallazgos más comunes en Fiebre manchada de las montañas rocallosas (RMSF por sus siglas en inglés) y también son comunes en la fiebre epidémica de tifus. Se logró determinar que sólo *E. canis* en comparación con *E. ewinggi*, *E. chaffensis* y el agente causal de la EGH (*E. equi*) es capaz de causar meningitis, caracterizada por causar encefalitis y gliosis en el neuroparénquima. (Pancieria et al., 2001). Por lo tanto es el tropismo por los monocitos y la habilidad de los mismos a sobrevivir por períodos prolongados los que sugieren que es posible el tráfico de las células infectadas en el SNC el cual se convierte en el mecanismo más probable (Douglas et al., 2004).

**Polineuropatías:** Es una manifestación de muchas enfermedades sistémicas, cancer, o puede ser inducida por toxinas. Las polineuropatías asociadas a reacciones entre autoanticuerpos policlonales o monoclonales y el sistema nervioso periférico y/o central tienen prevalencia baja, la detección de esta forma de polineuropatía es importante porque mediante su identificación se puede llegar al tratamiento de la causa del problema. Las polineuropatías se clasifican principalmente en agudas y crónicas. El síndrome Guillan –Barre es una neuropatía típica aguda que puede ser observada después de una infección viral o bacteriana, donde se ha sugerido que existe una reacción cruzada entre los lipopolisacáridos antibacterianos o virales y los antigangliósidos de los anticuerpos. En contraste las polineuropatías crónicas son asociadas a gamopatías monoclonales, las cuales existe una reacción en contra de la vaina de mielina (Abuaf, 2000).

### ***Respuesta del sistema inmune***

No existe predilección por edad o sexo, cualquier raza puede verse afectada por EMC, sin embargo, la raza Pastor Alemán no sólo demuestra ser más susceptible que otras razas, si no que la enfermedad en ellos es más

severa y de un pronóstico más pobre que en las otras. Las diferencias en susceptibilidad pueden ser atribuidas a diferencias existentes en la respuesta inmune tanto celular como humoral, ya que la respuesta inmunológica celular en esta raza resultó menor cuando fue comparada con la raza beagle. Los mecanismos inmunológicos están involucrados en la patogénesis de la EMC y estos incluyen la extensiva infiltración de los órganos parenquimatosos y la ocurrencia de hipergamaglobulinemia. Estos hallazgos sugieren la importancia de la respuesta inmunológica celular para la protección contra *E. canis* en cambio la respuesta inmunológica humoral no parece contribuir de manera importante en la protección pero si en la patogénesis de la enfermedad. El bazo también juega un papel de importancia en la patogénesis de las enfermedades inmunomediadas, y en casos de pacientes refractarios al tratamiento la esplenectomía puede estar indicada, la remoción del órgano que domina la producción de anticuerpos es también la eliminación de uno de los principales sitios del sistema fagocítico mononuclear; lo último es el principal objetivo de la esplenectomía en estos casos (Harrus et al., 1999).

En perros con erliquiosis el número de linfocitos CD8 T es mayor que la cantidad de CD4 T linfocitos a diferencia de lo encontrado en perros sanos. La cantidad de CD8 T es también significativamente mayor que en perros saludables lo que sugiere una alteración en la regulación del sistema inmune en pacientes que presentan la infección con la bacteria (Lorete-Méndez et al., 2004).

## **Evasión del sistema inmune**

Según estudios recientes el genoma de la bacteria contiene un sólo cromosoma circular con 1,315,030 nucleótidos. Este genoma ha sufrido de una pérdida severa de vías metabólicas, como resultado de la evolución reductiva en donde las enzimas de relevante importancia para la biosíntesis de lípidos A,

sáculos de mureína y del metabolismo de los peptidoglicanos, no se encuentran presentes, lo que sugiere que los peptidoglicanos y lipopolisacáridos se encuentran ausentes de la membrana externa de *Ehrlichia spp E. chaffenesis* y *A. phagocytophilum*, las cuales adquieren colesterol del hospedador y lo incorporan en la membrana externa posiblemente para compensar la disminución de la estabilidad de membrana debido a la falta de peptidoglicanos. Lo anterior ha permitido la adaptación del patógeno al hospedador especialmente en infecciones persistentes, lo que permite que el organismo desarrolle mecanismos que permitan la evasión de sistema inmune del hospedador. Esto se encuentra íntimamente relacionado con la reducción del sistema de inmunidad innata y adaptativa del hospedador mediante la alteración de la arquitectura de superficie y de la expresión de variantes de proteínas. También la falta de peptidoglicanos y lipopolisacáridos, los cuales son los mayores patrones moleculares encontrados en las paredes celulares de las bacterias gram negativas, sugiere que la bacteria pudiera no ser reconocida por el patrón sistema inmune innato como lo son los receptores Toll. Las proteínas glicosiladas juegan un papel importante en la interacción huésped patógeno, así también como en el ensamble de envolturas para proteínas. Y una particularidad de *E. canis* es que las proteínas exhiben un alto contenido de serina-treonina las cuales pueden ser objeto de estudio para el desarrollo de vacunas y drogas (Mavromatis et al., 2006).

Estudios basados en *E. chaffenesis* han demostrado que existe una regulación negativa, donde se reprimen citocinas que modulan la inmunidad innata y adaptativa lo que evita la estimulación de IL-12 por lo que al igual que en casos de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, *leishmania*, e *histoplasma* se desarrolla la habilidad de sobrevivir dentro del macrófago ya que inhibe la maduración del endosoma así como evade la unión del fagolisosoma de manera que evita ser destruida por enzimas lisosomales, permanece dentro del fagosoma donde se reproduce y, al mismo tiempo reprime la producción de IL-15 y IL-18, quienes tienen un papel fundamental en los roles de estimulación

NK y T helper quienes producen gama interferón que activa a los macrófagos para matar a las bacterias fagocitadas. En concreto el microorganismo tiene la habilidad de evasión de la inmunidad innata y adaptativa. Así como también inhibe la apoptosis en estadios tempranos de la infección regulando la liberación de citocromo mitocondrial y evita la activación de macrófagos por medio de la regulación negativa de interferones e interleucinas. También tiene la capacidad de arrestar a las células en el estadio G1 durante etapas tempranas de infección, y regula de manera positiva la proliferación de ciclinas para evitar que la célula muera debido a una infección progresiva (Zhang et al., 2004).

## ***Epidemiología***

Las enfermedades causadas por rickettsias son asociadas con artrópodos, los cuales pueden actuar como vectores, reservorios y/o amplificadores de los ciclos de vida de bacterias (Didier y Roux, 1997). La EMC es transmitida por la mordedura de la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) la cual tiene distribución mundial (Beeching et al., 2000). Aunque ha sido documentada su transmisión *Dermacentor variabilis* (Bremen et al., 2005). En los hospedadores vertebrados naturales, las infecciones progresan a una rickettsemia, que permite que nuevas líneas de garrapatas no infectadas se infecten y de este modo perpetuar el ciclo natural (Parola et al., 2005). Las garrapatas requieren de sangre para su nutrición, las bacterias necesitan de un ambiente nutricionalmente rico en el cual sobrevivir y reproducirse. Inmunológicamente los perros parecen ser capaces de soportar la infección durante meses y hasta por años sin la presentación de efectos deteriorantes. *Rhipicephalus sanguineus* tiene 4 estadios de vida: huevo, larva, ninfa y adulto, los dos últimos son los más importantes en cuanto a la transmisión de agentes que causan enfermedad. Para alimentarse del huésped la garrapata se adhiere e inserta su aparato de alimentación sofisticado (hipostomo), la saliva es inyectada durante este proceso para anestesiarse el sitio y evitar la respuesta

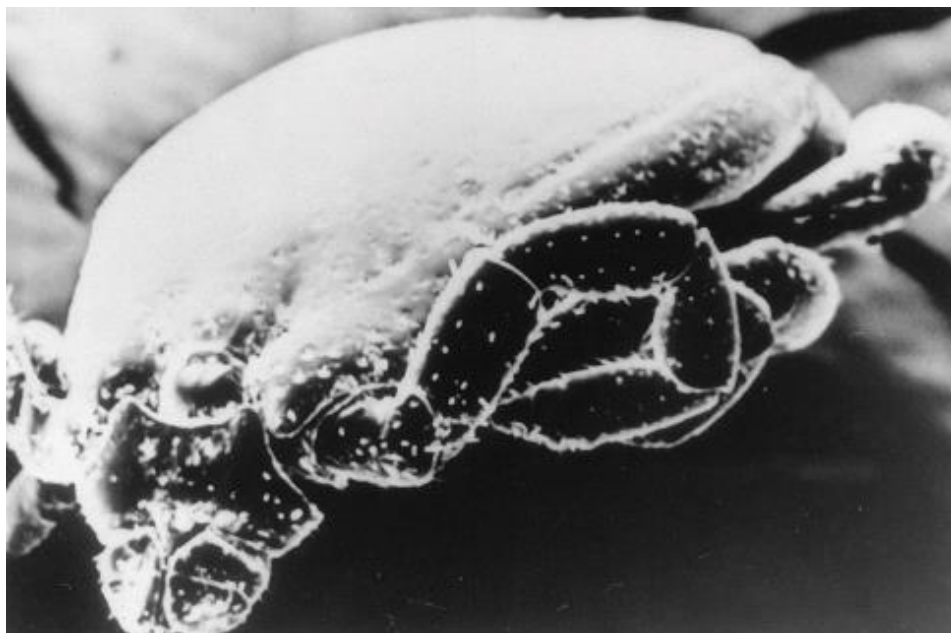


Figura 6. Garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Magnificación x 5,000, Didier y Roux, (1997).

inmune o inflamatoria del hospedador y así asegurar un proceso de alimentación prolongado y exitoso, el cuerpo de la hembra puede aumentar hasta 100 veces durante el periodo de alimentación y es durante la salivación y regurgitación que la mayoría de los patógenos son transmitidos de manera eficiente, las heces y la sangre no digerida también es depositada en el sitio y en algunos casos pueden ser factores para la transmisión de otras enfermedades (Kidd y Breitschwerdt, 2003). No solo se ha comprobado el papel de la hembra en la transmisión de la enfermedad hoy en día se sabe que el macho de la especie *Rhipicepalus sanguineus* es capaz de transmitir la enfermedad en ausencia de la hembra. *E. canis* fue detectada tanto transtradialmente como intrastradial (Bremen et al., 2005).

La infección se transmite cuando esta garrapata se alimenta en un nuevo huésped y debido a que la transmisión transovárica no existe, el vector no puede servir como reservorio de la enfermedad, aunque el artrópodo puede permanecer infectado por largos periodos de tiempo permitiendo la transmisión de la enfermedad la primavera después de que ésta ha invernado (Beeching et al., 2000).

## **Prevalencias históricas**

Existen informes de EMC en 4 continentes, América, África, Asia y Europa (Harrus et al; 1997). Las prevalencias informadas alrededor del mundo son: Castilla-León 19.2%(Sainz et al., 1996), 19.8% Brasil (Labarthe et al., 2003) ,Sicilia 21.7% (Torina y Caracappa., 2006), 23.9% Israel (Baneth et al.,1996), así como el 33% Egipto (Bortos et al., 1995), en Sardinia Italia 62.5% (Cocco et al., 2003), 3.1% Oklahoma (Murphy et al., 1998). En México Núñez, 2002, realizó un estudio a nivel nacional donde obtuvo una seroprevalencia de 33.1%, calculando una prevalencia del 70% para el estado de Baja California , en otras ciudades de México como en Yucatán los datos arrojados fueron

44.1% (Rodríguez-Vivas et al.,2004), y 58% en la ciudad de Tecoman, Colima (Campos et al.,2006). Las discrepancias entre regiones se deben quizá al tipo de estudio, región geográfica , clima, la presencia del vector en la región de estudio, así como la fase de enfermedad en la que se encuentre el paciente al momento del muestreo. En esta región existe evidencia serológica y molecular de *E. canis* (Tinoco-Gracia et al. 2007).

## ***Diagnóstico***

El diagnóstico de la EMC se realiza en base a la signos clínicos, anormalidades hematológicas, trombocitopenia y en ocasiones es posible observar la mórula en monocitos; y como herramientas más específicas los detección de anticuerpos y el uso de la biología molecular resultan más recomendables (Green, 1998). Es importante tomar en cuenta que los hallazgos variarán según la fase de enfermedad en que se encuentre el paciente al momento de realizar el diagnóstico, por lo que no se deben olvidar las limitaciones diagnosticas que poseen algunas pruebas, por lo tanto el diagnóstico requiere de una combinación entre signos clínicos y hallazgos en pruebas diagnósticas.

**Medición de plaquetas:** La trombocitopatía o trombopatía son términos que pueden ser utilizados para describir los defectos funcionales plaquetarios, y puede ser sugerida cuando el tiempo de sangrado en la mucosa bucal sea prolongado o cuando exista un conteo anormal de plaquetas. La pérdida de la funcionalidad de estas contribuye a defectos hemostáticos que se manifiestan con frecuencia como petequias, púrpura y equimosis. El mecanismo de trombocitopenia en esta enfermedad puede involucrar, destrucción por el sistema inmune, disminución en la producción, aumento en el consumo, disminución en el tiempo de sobrevivida de la célula o secundaria al incremento en las concentraciones del factor inhibidor de la migración plaquetaria. Debido a

la alta prevalencia de trombocitopenia en perros infectados con *E. canis*, el uso del conteo plaquetario ha sido propuesto debido a que este es un examen de bajo costo y confiable en una zona endémica para ser realizado antes de un examen diagnóstico confirmatorio de la enfermedad. La relación entre la magnitud de la trombocitopenia y la prevalencia de la enfermedad aun no ha sido establecida. Aunque la diferencia radica en las diferentes causas y fases de la enfermedad en que se encuentre el paciente tal es así que en pacientes que cursan la fase subclínica muestran ligera trombocitopenia, los que se encuentran en la fase aguda muestran trombocitopenia más severa comparados con los que cursan por la fase crónica. Un conteo plaquetario normal no descarta la presencia de la enfermedad aunque solo un porcentaje bajo de los pacientes no trombocitopénicos presentan la infección (Bulla et al., 2004). Sin embargo existen numerosas enfermedades que pueden causar trombocitopenia como en enfermedad hepática, neuropatía, disproteinemia, agentes virales como parvovirus, trombocitopenia inmunomediada, procesos neoplásicos, coagulación intravascular diseminada, procesos inflamatorios u otros agentes infecciosos y defectos heredados. Ninguna de estas etiologías debe de ser descartada una vez que ha sido identificada la trombocitopenia aún en un área endémica. Además es importante hacer mención que puede ser inducida por drogas como analgésicos no esteroideos, expansores de plasma y agentes condroprotectores. Por lo anterior se aconseja mantener como diagnóstico diferencial *E. canis* en presencia de trombocitopenia, siendo la medición plaquetaria una buena prueba antes de la realización de pruebas más específicas y más costosas (Ruiz y Feldman, 1998).

**Hemograma:** Los cambios hematológicos incluyen anemia, que por lo general es no regenerativa, trombocitopenia, leucopenia que en algunos casos presentan neutropenia. Pancitopenia es usual como resultado de la hipoplasia de la médula ósea y ocurre en la fase crónica severa y más frecuentemente en la raza Pastor Alemán (Green 1998).

**Química sanguínea:** La hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia son las anormalidades bioquímicas predominantes. La hipoalbuminemia es consecuencia de la pérdida de albúmina a través de fluidos inflamatorios edematosos como resultado de un incremento en la permeabilidad vascular, pérdida de sangre o disminución en la producción de proteínas debido a una enfermedad hepática o también pudiera causarla una glomerulopatía. Como la síntesis de albúmina es regulada por la presión oncótica, la disminución de la concentración de esta actúa como mecanismo compensatorio en el estado hiperglobulinémico para mantener la presión oncótica y prevenir un aumento de la viscosidad sanguínea. La hipergamaglobulinemia es usualmente policlonal. La gamopatía monoclonal rara vez ocurre y puede ocasionar hiperviscosidad y sus manifestaciones clínicas asociadas. Las concentraciones de gammaglobulinas aumentan durante la fase febril de la enfermedad y persiste en la fase subclínica y crónica. Existe una relación muy pobre entre la correlación de gama globulinas y los títulos de anticuerpos. También se ha relacionado la presencia de concentraciones elevadas de  $\alpha$  y  $\beta$  globulinas donde la concentración de  $\alpha_2$  globulina se eleva durante el día 4 y disminuye a los niveles preinfección en el día 34, esto puede deberse a consecuencia del daño de inflamación a tejidos, ya que su síntesis es estimulada en el hígado por mediadores endógenos (Harrus, 1999).

**Búsqueda de la Mórula:** La examinación microscópica directa con la tinción Romanowsky, Giemsa o Diff-Quick de un barrido, es una técnica accesible y provee de evidencia permanente. *Ehrliquia spp* aparecen como agrupaciones redondas teñidas de un morado intenso, pequeños puntos o agrupaciones pueden aparecer como manchas con apariencia de mora (mórulas) en el citoplasma de leucocitos. Se debe evitar la confusión de las mórulas con plaquetas, gránulos linfocíticos azurófilos, cuerpos linfoglandulares y material nuclear fagocitado (Mylonakis et al., 2003). La búsqueda de la morula puede ser realizada mediante diferentes procedimientos descritos a continuación. La sensibilidad varia puede lograrse de un 4% hasta un 66%. Un

barrido negativo no excluye en ningún momento la infección por *E. canis* ya que la presencia de monocitos en circulación periférica es escasa. Sin embargo un resultado positivo es 100% específico y provee de un diagnóstico definitivo (Rikihisa, 1991).

**Examen microscópico directo de frotis sanguíneos en sangre periférica:** La examinación microscópica directa de un barrido de sangre periférica es simple. La especificidad de este método es del 100% sin embargo la sensibilidad es muy baja se ha encontrado que es de solo 4% en casos positivos (Bulla et al., 2004).

**Examen microscópico de barrido de la capa flogística:** Este procedimiento aumenta la sensibilidad debido a que se encuentran las células blancas concentradas. Se recomienda centrifugar la sangre contenida en un tubo con EDTA como anticoagulante, se toma la muestra con una pipeta en capa flogística y se realiza el barrido. Este procedimiento se considera en animales que no presentan linfadenomegalia. La sensibilidad es de 66% (Mylonakis et al., 2003).

**Examen microscópico de aspiración con aguja delgada de linfonódo:** Este método se utiliza en casos de linfadenomegalia la cual se presenta solo en fase aguda de la enfermedad y la sensibilidad aumenta a un 60.9%. Realizar punción de linfonodos en los que no se encuentre presente clínicamente linfadenopatía la sensibilidad disminuye a 30% “menos de la mitad” que en perros con linfadenopatía (Mylonakis et al., 2003).

**Examen microscópico de médula ósea / bazo:** Este procedimiento se estima más efectivo que la examinación de sangre periférica pero no mejor que la examinación de capa flogística o una aspiración de linfonodo. El método resulta invasivo ya que requiere de anestesia, técnica

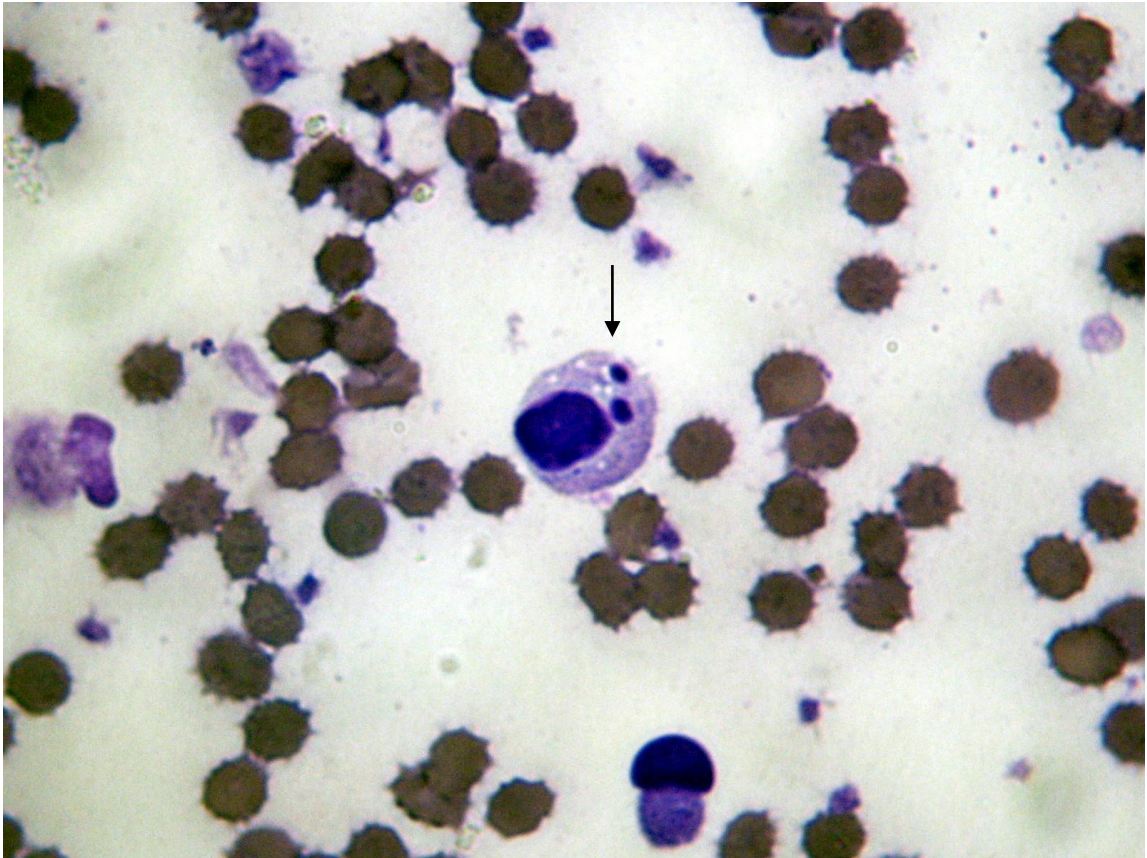


Figura 7. Barrido de capa flogística en sangre periférica. Notar que en el contenido de la célula mononuclear existe un conglomerado en semejanza a *Rickettsias* . Tinción Diff quick . Fotografía por: Paulina Haro

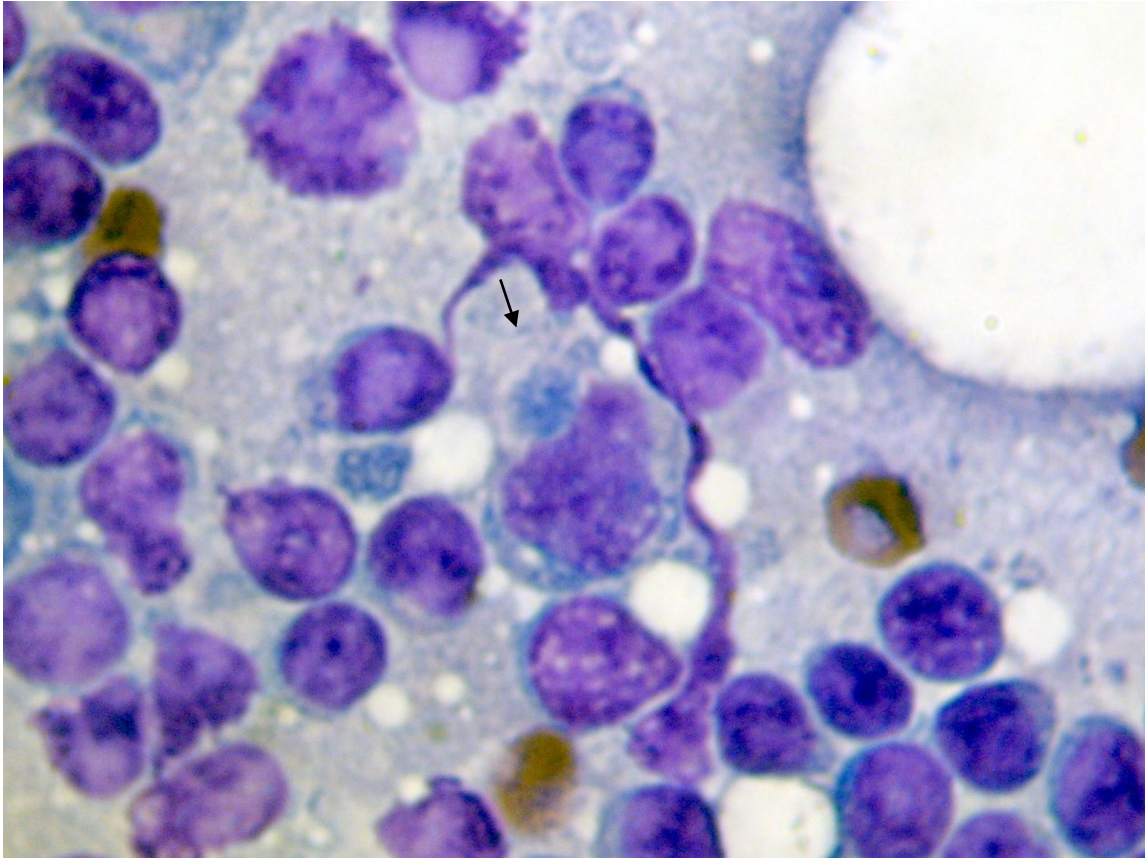


Figura 8. PAD Ganglio linfático en un paciente con linfadenomegalia y signos de erliquiosis monocítica canina . Note que la célula mononuclear contiene una estructura en su citoplasma empaquetada que asemeja una mórula de organismo rickettsial. Tinción Diff Quick. Fotografía: Paulina Haro

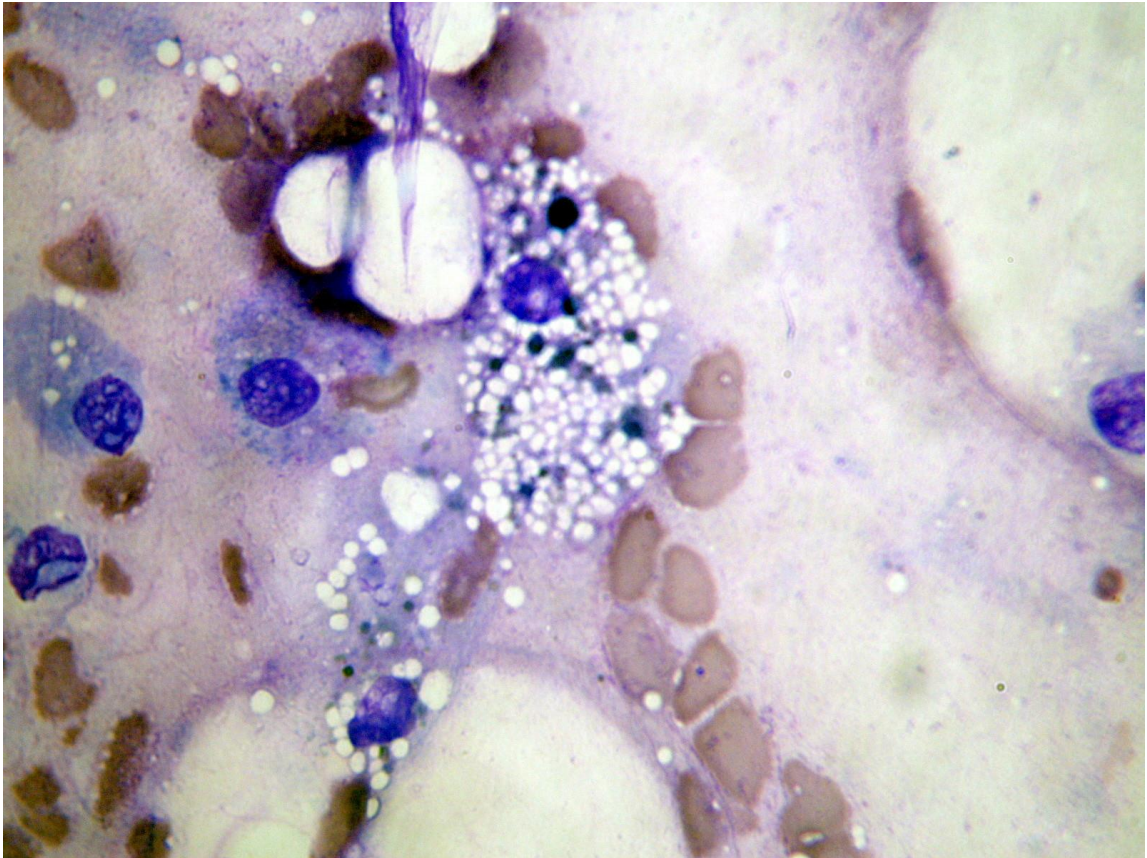


Figura 9. Aplasia medular encontrada en un paciente con erliquiosis monocítica crónica. Fotografía por: Paulina Haro

aséptica y equipo especializado, la punción de bazo requiere sujeción química, se recomienda sea guiada por ultrasonido para evitar punciones inadvertidas a otro órgano así como para el monitoreo de posibles sangrados como consecuencia de la punción. El riesgo de este procedimiento no justifica el resultado ya que las posibilidades de un resultado positivo son similares a las de un barrido de sangre periférica (4%) Mylonakis et al., 2003.

## **Cultivo**

Cultivo sanguíneo requiere de 4 a 8 semanas para la obtención de los resultados. Debido a que es un parásito obligado solo se ha logrado su cultivo en células mononucleares o saco vitelino, por lo que es necesario de un laboratorio equipado para este tipo de procedimientos. El organismo es propagado en monocitos caninos (Zafar et al., 1994).

## **Serología**

Estas pruebas son diseñadas para la detección y valoración de anticuerpos contra *E. canis*. Los métodos serológicos son efectivos para detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* pero la seroconversión solo es indicativa de una exposición y no de la presencia de la enfermedad (Roger et al., 2002). Las pruebas comerciales miden anticuerpos IgG, pero se ha demostrado que en perros experimentalmente infectados el período para la detección de anticuerpos inicia entre el día 11 al 28 post infección (Miodrag et al., 1972). Durante los primeros 7 días postinfección los títulos consisten en IgA e IgM, y para el día 20 la mayoría de ellos son IgG. Una limitación de la serología es la reactividad cruzada que puede ocurrir entre antígenos de organismos que se encuentran dentro del mismo género. Debido a lo anterior la serología solo debe ser considerada como el primer paso en el diagnóstico de una enfermedad por *rickettsias* (Parola et al., 2005). Después del tratamiento en la mayoría de los perros los títulos disminuyen progresivamente y se convierten en pacientes negativos en un lapso de 6 a 9 meses postratamiento.

Algunos animales se convierten en portadores asintomáticos después de la terapia y retienen títulos altos de *E. canis* durante años. No siempre puede ser determinado en que situaciones el organismo persiste o el anticuerpo persiste. Clínicamente en los animales tratados se asume que el organismo se ha eliminado cuando la hiperglobulinemia y otros signos clínicos y hallazgos de laboratorio resuelven progresivamente después del tratamiento (Green, 1998). Por lo anterior el diagnóstico requiere de conocimiento del tipo de prueba utilizada, los alcances y limitaciones de las mismas que en conjunto con los signos clínicos presentes al momento de la toma de muestra y el tipo de prueba utilizada permitirá lograr un diagnóstico más acertado.

**Inmunofluorescencia directa de anticuerpos (IFA):** Es el examen de diagnóstico serológico para EMC más ampliamente utilizado desde su desarrollo en el año de 1972 y es considerada en serología “la prueba de oro” para la detección de anticuerpos contra *E. canis* (Harrus et al., 2002). Es un método específico y aplicable tanto en condiciones experimentales como en naturalmente inducidas de EMC. La propagación *in vitro* es un prerrequisito para el desarrollo de una prueba serodiagnóstica confiable de IFA (Rikihisu, 1991). Es una prueba que toma tiempo y requiere el cultivo y purificación del organismo completo y no pueden realizarse múltiples pruebas a la vez, así como también requiere de equipo especial como el microscopio de fluorescencia (Tamece et al., 2003). El organismo es propagado mediante una técnica *in vitro* en sangre particularmente monocitos caninos y este sirve como el antígeno en la prueba. Debido a la persistencia de los anticuerpos después del tratamiento o de la recuperación, una titulación positiva no indica necesariamente que el animal este enfermo o los signos clínicos presentes se deban a erliquiosis, especialmente en áreas endémicas con títulos de *E. canis* y sin signos clínicos. Al mismo tiempo esta prueba puede arrojar fácilmente resultados falsos negativos si el espécimen no es manejado apropiadamente o el antígeno no se preparó de manera adecuada, además no es muy confiable en términos de sensibilidad ya que no puede distinguir entre una infección

actual y una exposición previa sin establecimiento de la infección o una infección previa (Zafar et al., 1994). En perros con signos clínicos de erliquiosis y ausencia de títulos de *E. canis* se recomienda realizar la prueba para detección de IgG para Fiebre manchada de las montañas rocallosas (RMSF por sus siglas en inglés) Green, 1998.

**Inmunoabsorbencia unida a enzimas (ELISA):** Existen varios tipos diferentes de pruebas para realización de ELISA a continuación se citan los más utilizados, está rMAP2-ELISA, esta prueba está diseñada para realizarse en laboratorios debido a que requiere equipo específico (lector de ELISA) consume mucho tiempo y es cara, la diferencia radica en el hecho de que utiliza un antígeno específico lo que debería conferirle propiedades de ser más específica pues disminuye las posibilidades de reacciones cruzadas con anticuerpos no específicos. También se han desarrollado numerosas pruebas comerciales que detectan anticuerpos de inmunoglobulina G, diseñadas para su uso en las clínicas y que se encuentran en el mercado actualmente, estas son Immunocomb® (Biogal Israel) y Helica® (Helica Biosystems Inc® Fullerton, CA, USA) las cuales utilizan a la rickettsia completa como fuente de antígeno, por lo cual es más sensible pues tiene la habilidad de reaccionar a un mayor número de antígenos, por último se encuentran el Snap® y el 3Dx® (laboratorios IDEXX USA) estas utilizan 2 proteínas específicas de *E. canis* (p30 y p30-1) como fuente de antígeno. Las diferencias entre el uso de una sola o una doble proteína recombinante en contra del cultivo del organismo completo causa diferencias en la reactividad y puede afectar la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas (Harrus et al., 2002). Existen reacciones cruzadas entre las diferentes especies entre las cuales se ha documentado a *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, *Neorickettsia helminthoeca* y *Rickettsia rickettsii* (Belanger et al., 2002).

**Western blot:** Se ha utilizado para la caracterización y distinción entre las diferentes especies de organismos que causan erliquiosis. La bacteria

muestra un número de antígenos reactivos de los cuales los más prominentes entran dentro de la banda de 27kd (22-29 kd). Detecta anticuerpos contra *E. canis* dentro de los días 2 a 8 postinfección (Green,1998). En esta técnica la proteína de interés se separa mediante electroforesis tras la resolución tanto en geles unidimensionales como bidimensionales, una determinada proteína puede identificarse exponiendo todas las proteínas presentes para un anticuerpo específico que ha sido acoplado a un isótopo radiactivo, a una enzima fácilmente detectable o a un colorante fluorescente. Esto se realiza después de que todas las proteínas presentes en el gel se han transferido a membrana de celulosa o nylon (Bray et al., 2001). Sin embargo no es un método diagnóstico conveniente debido a que se necesitan de 14 a 34 días para la obtención de los resultados (Harrus et al., 1997). El western blot no distingue entre especies de *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *E. canis* (Breitschwerdt et al.1998).

**Reacción en cadena a la polimerasa:** Es una de las innovaciones tecnológicas de diagnóstico molecular para la detección e identificación de microorganismos lleva el nombre de reacción en cadena a la polimerasa (PCR) fue desarrollada por el biólogo molecular Kari Mullis en el año de 1986, la cual le confirió el premio nobel de química en el año 1993, esta fue la innovación más importante del siglo en la rama y también a sido la introducción a una nueva era con respecto a la microbiología diagnóstica (Mullis et al., 1986). Es una herramienta más refinada útil para distinguir entre animales tratados y/o con infección persistente de aquellos con títulos altos de IFA después de un tratamiento exitoso, arroja resultados positivos a partir de los 4 a 10 días post infección en estudios experimentales (Green, 1999). El PCR utiliza oligonucleótidos universales seguido de la identificación del producto amplificado, principalmente por secuencias, lo cual permite la identificación de bacterias ya sea que estas sean cultivadas o no. El método consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación y extensión a la polimerasa, al catalizarse se duplica en cada ciclo en una cantidad de fragmentos definidos por la posición 5' de ambos templados de DNA (Mullis et al., 1986).

El PCR fue la primera herramienta diagnóstica (junto con el examen de barridos de sangre) desarrollada para el diagnóstico de la erliquiosis humana. Muestras de sangre periférica o médula ósea son las de elección (Fellonar y Didier 2004).

La detección de patógenos en huéspedes vertebrados e invertebrados es una herramienta importante para estudios experimentales en enfermedades transmitidas por artrópodos, y es crítico para el entendimiento de la naturaleza de la transmisión del patógeno. Los análisis de PCR en genes tienen un blanco único para el organismo. La detección de *E. canis* en garrapatas es una prueba novedosa que es de utilidad para monitoreo de la transmisión experimental cuando se conducen investigaciones epidemiológicas pues identifica vectores infectados y también existe la posibilidad de identificar al huésped vertebrado a través de xenodiagnóstico. Hasta el momento se ha reportado un PCR basado en *p30* como una herramienta de valor en el marco experimental para el estudio de *E. canis* en huéspedes vertebrados e invertebrados, *p30* es una proteína de membrana externa codificada por varios genes repetidos en tandem que son especie-específicos además que no amplifica para DNA de *E. chaffensis* o *E. muris* comparados con el PCR anidado 16S ribosomal ADN, el cual fue desarrollado con anterioridad para el análisis de bajos niveles de *E. canis* en sangre canina después de la terapia con antibióticos, ya que este no mostró el nivel de sensibilidad deseado para la detección de *E. canis* en garrapatas individuales que fueron afectadas experimentalmente. Por lo anterior se recomienda el PCR *p30* anidado como el indicado para la detección de vectores. Es posible a través de estas técnicas detectar coinfección con otras especies del mismo género en este caso ha sido demostrado la coinfección simultánea con *E. canis*, *E. platys* y *E. equi*. (Jiraporn et al., 2001; Roger et al., 2002).

## **Tratamiento**

El tratamiento consiste en agentes antirickettsiales y tratamiento de sostén. Generalmente entre más temprano es aplicado el tratamiento más favorable es el pronóstico (Cuadro 2). La recuperación no va de la mano con la inmunidad permanente, y los perros pueden reinfectarse después de un tratamiento efectivo (Green, 1998).

**Tetraciclinas:** Las tetraciclinas fueron descubiertas en los años cuarentas, son una familia de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas evitando la adhesión de tRNA aminoacilo al sitio aceptor ribosomal. Son agentes de amplio espectro que tienen actividad contra un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas, así como de organismos atípicos como lo son las clamidias, micoplasma, parásitos protozoarios y rickettsias. Las propiedades favorables antimicrobianas de estos agentes así como la ausencia de efectos adversos mayores permiten su uso extensivo en la terapia de infecciones en animales. Doxiciclina y minociclina son tetraciclinas semisintéticas solubles en lípidos que pueden ser administradas en tiempos menores que las tetraciclinas sin perder su efectividad (Chopra y Roberts., 2001). Las tetraciclinas se distribuyen al corazón, riñones, pulmón, músculo, líquido pleural, secreciones broquiales, esputo, bilis, saliva, orina, líquido sinovial, líquido ascítico, humor vítreo y acuoso, solo pequeñas cantidades de tetraciclina y oxitetraciclina son distribuidas al sistema nervioso central y los niveles terapéuticos a este nivel no pueden ser medidos, aunque las tetraciclinas se distribuyen a ojo y próstata, la doxiciclina y minociclina penetran mejor éstos y otros tejidos. Las tetraciclinas cruzan la barrera placentaria entran a circulación fetal y se distribuyen en la leche. Tanto las tetraciclinas y las oxitetraciclinas se eliminan sin cambio por vía renal por lo que en pacientes con la función renal comprometida presentan una vida media prolongada por lo que pudiera llegar a

**Cuadro 2.- Terapia antimicrobiana contra *E.canis***

<b>Droga</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Ruta</b>	<b>Intervalo (horas)</b>	<b>Duración (días)</b>
Doxiciclina	10	PO (IV)	12-24	28
Minociclina	10	PO (IV)	12	28
Tetraciclina	22	PO	8	28
Oxitetraciclina	25	PO (IV)	8	28
Cloranfenicol	15-25	PO (IV,SC)	8	28
Imidocarb dipropionato	5	IM	Una ocasión	Repetir 2-3 semanas
Amicarbalida	5-6	IM	Una ocasión	Repetir 2-3 semanas

Adaptado de Green (2006)

acumularse las dosis. La administración de las tetraciclinas a animales jóvenes puede provocar coloración de los huesos y piezas dentales de un amarillo, café o tono grisáceo y a altas dosis puede provocar retraso en el crecimiento de los huesos y cicatrización (Plumb, 2002). Son una de las clases de antibióticos más económicos, y su costo ha disminuido debido a que la tecnología de manufactura ha mejorado. Su precio las hace atractivas particularmente en países en desarrollo (Chopra y Roberts, 2001). La mejoría es dramática y ocurre a partir de las 24 a 48 horas posteriores al inicio de la terapia en perros en fase aguda o crónica ligera. La cuenta plaquetaria inicia su incremento y usualmente llega a su rango normal en los días 14 posteriores al inicio del tratamiento. La recuperación no va de la mano con la inmunidad permanente, y los perros pueden reinfectarse después de un tratamiento efectivo (Green, 1998). Es importante hacer notar que la tetraciclinas son efectivas durante la fase aguda, los animales que se encuentran crónicamente afectados no responden al tratamiento con tetraciclinas, esto puede deberse a la falta de actividad bactericida de estos componentes (Branger et al. 2004).

**Doxiciclina Hyciclato** : Es una tetraciclina semisintética, es el tratamiento estándar para la EMC, la doxiciclina como las otras ciclinas, tiene actividad bacteriostática ligándose a los ribosomas impidiendo de esta manera la síntesis ribosomal, ya que la bacteria requiere de proteínas para impedir la fusión del fagolisosoma dentro del monocito infectado (Shawn y Rubis, 1986 en Davoust et al., 2005). Esta droga genera una excelente actividad contra bacterias tanto gram positivas como gram negativas y patógenos aeróbicos y anaeróbicos. La absorción oral de este medicamento es rápida y no disminuye su actividad si es administrada junto con el alimento. Debido a la vida media esta puede ser administrada 1 vez al día. Esta penetra de manera excelente a tejidos obteniéndose niveles terapéuticos en la mayoría de los órganos y tejidos como lo son el riñón, pulmón, vesícula biliar, próstata, intestino, miocardio, senos paranasales, tonsilas, humor acuoso y tracto reproductor de la hembra (Cunha et al., 1982).

**Rifampicina:** Existe estudios donde comentan tratamientos exitosos utilizando este medicamento en los cuales se encuentran resultados iguales que con el uso de la doxiciclina (Branger et al. 2004).

**Cloranfenicol:** Originalmente fue aislado de *Streptomyces venezuelae*, pero ahora se produce de manera sintética. Actúa como antibiótico bacteriostático, pero a altas concentraciones contra organismos muy susceptibles puede actuar como bactericida. El cloranfenicol se une a la subunidad ribosomal 50S evitando la síntesis de proteínas. Tiene afinidad para los ribosomas de células de mamífero en rápido crecimiento (médula ósea) lo cual puede resultar en una supresión de la médula ósea irreversible. Presenta un amplio espectro contra bacterias gram positivas como negativas en los que se incluyen *Rickettsia* entre otros. Presenta niveles terapéuticos en la mayoría de los tejidos y fluidos incluyendo humor vítreo, humor acuoso y, líquido sinovial y en sistema nervioso central alcanza concentraciones del 50% cuando las meninges no se encuentran inflamadas y niveles más elevados cuando estas se han inflamado. La vía primaria de eliminación es la hepática (Plumb, 2002). Se recomienda en cachorros mayores de 5 meses de edad para evitar que las piezas dentales se tornen de color amarillento. Debe de ser usada en pacientes con infecciones persistentes a pesar de la terapia con tetraciclinas. Debido a los riesgos asociados con la administración de esta drogas y su riesgo para la salud pública (puede causar anemia aplásica) se deberá evitar su administración en pacientes anémicos o pancitopénicos cuando sea posible (Green,1998).

**Enrofloxacin:** En algunos estudios experimentales no ha demostrado ser efectiva en contra de *E. canis* en comparación con doxiciclina, pero si en contra de otras rickettsias como en RMSF.

**Dipropionato de Imidocarb:** esta aprobado su uso para el tratamiento de *babesia canis* en perros y ha demostrado ser efectiva en la eliminación del microorganismo *E. canis* en esta especie. Se cree que actúa mediante combinación con los ácidos nucleicos en los organismos susceptibles, causando desnaturalización de los mismos. Este daño impide la reparación celular y también su multiplicación. No existe información específica acerca de la farmacodinamia y farmacocinética. Se recomienda no se utilice en pacientes que estén expuestos a drogas anticolinesterasa, pesticidas o químicos. No se ha establecido la seguridad de su uso en cachorros, gestación y lactancia deberá considerarse el riesgo contra el beneficio en pacientes con alguna disfunción orgánica. En pacientes sobredosificados pueden presentar daño hepático (Plumb, 2002). Se recomienda su uso en conjunto con doxiciclina (Green, 1998).

**Glucocorticoides:** Una terapia de corto plazo con glucocorticoides puede ser benéfica al inicio del tratamiento cuando existe una trombocitopenia severa o que amenaza la vida del paciente debido a que existe un mecanismo inmunomediado que se involucra de manera parcial como responsable de la trombocitopenia y disminución de la función plaquetaria. No deben de ser descartados en situaciones de hemorragia que amenazan la vida del paciente, debido a que son de ayuda al reducir la tendencia al sangrado por causas variadas como desordenes trombocitopénicos primarios (Green, 1998).

### ***Prevención y control***

Debido a que la exposición a *E. canis* no confiere inmunidad protectora y aún no a sido desarrollada una vacuna contra *E. canis* con resultados satisfactorios, la quimioprofilaxis y el control de las garrapatas hasta este momento son los pilares para la prevención de esta enfermedad (Green, 1998; Preziosi y Cohn., 2002). El uso profiláctico de tetraciclinas durante la temporada

de garrapatas a sido utilizada, pero esta opción no se encuentra libre de riesgos tomando en cuenta el costo del antibiótico y sus posibles efectos adversos (Preziosi y Cohn., 2002). El control de la garrapatas permanece siendo la medida preventiva más importante contra la infección de *E. canis*. El método más aceptable es el uso de acaricidas. Muchos productos han sido desarrollados Frontline® Top spot (Merial Ltd, Iselin NJ), Preventic® collares (Virbac, Inc., Fort Worth, TX) y Kiltix® Control de garrapatas tópico (Bayer animal health, Shawnee Mission, KS) Preziosi y Cohn., 2002.

### **Medicamentos desparasitantes**

**Fipronil:** Es un inhibidor no competitivo de ácido gamma-amino-butírico (GABA). El GABA es un neurotransmisor que inhibe el sistema nervioso central en invertebrados. Después de ser aplicado en la piel, este se difunde en menos de 24 horas a gradientes de concentración, a través de todas las estructuras epidérmicas que contienen lípidos (estrato corneo, cemento intercelular y cebo) El fipronil confiere una eficacia mínima de 95% contra *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor reticularis* por más de 29 días. Una vez que el animal infestado a sido tratado con fipronil, el efecto letal contra *Rhipicephalus sanguineus* inicia 12 horas después de aplicada la solución cutánea y el pico letal se obtiene después de las 24 horas. (Davoust et al. 2003).

**Quimioprevención:** Estudios llevados a cabo en Francia demuestran la efectividad del uso de la Doxiciclina. Se utilizaron cápsulas de 100 mg con capa entérica, una vez al día junto con la comida. Se determinó que la dosis mínima inhibitoria para las especies de *Ehrlichia* debe ser  $< 0.03 \mu\text{g/ml}$ . Sin embargo el riesgo de desarrollar resistencia contra *E. canis* debe de ser tomado en cuenta de manera seria, porque diferentes bacterias ya han demostrado ser resistentes a esta droga (*Staphylococcus aureus*, *Pasteurella spp*, *Brucella spp*). Por lo

anterior al utilizarla como preventivo existe el riesgo de provocar resistencia a la droga (Davoust et al., 2005).

**Vacunación :** Aun no ha sido desarrollada una vacuna efectiva contra *E. canis*. En una serie de estudios acerca de inmunizaciones utilizando antígeno inactivado de *E. canis* derivado de un cultivo celular, fortificado con adyuvantes, indujo buenos niveles de respuesta con anticuerpos, sin embargo las manifestaciones clínicas mostraron ser más fulminantes que en los perros no inmunizados tomados como control. En comparación con otro estudio realizado recientemente donde 5 perros pastor Alemán fueron vacunados con *E. canis* inactivada utilizando el coadyuvante Quil A, y se utilizó solamente el coadyuvante antes mencionado en 2 perros control, demostraron mediante Western blot la inducción de una respuesta inmune celular y humoral después de la inmunización, posteriormente se indujo la infección con *E. canis* viva lo que resulto en signos clínicos moderados y cambios hematológicos lo cual sugiere una protección parcial derivada del *E. canis* inactivada (Mahan et al., 1999).

También existen vacunas atenuadas he inactivadas provenientes de organismos que tienen relación cercana con erliquia como lo es *Crowdia ruminantium* las cuales han demostrado producir protección en rumiantes pequeños. Recientemente los genes que codifican para los antígenos de superficie 28 y 30 kDa de *E. canis* fueron clonados y secuenciados, esto puede dar pie al desarrollo eventual de una vacuna recombinante contra EMC, aunque no resulta fácil debido a la variación antigénica entre cepas provenientes de diferentes localidades. El desarrollo de una vacuna para EMC tendría repercusiones en cánidos salvajes e implicaciones socioeconómicas significativas, serviría como modelo para el desarrollo de vacunas anti-erliquia especialmente con aplicaciones en erliquiosis humanas (Harrus, 1999).

Mahan (1999) investigó estrategias para el desarrollo de una vacuna contra *C. ruminatum* y su aplicación para agentes del genero *Ehrlichia*, determinó que vacunas inactivadas utilizando células de cultivo del agente *C. ruminatum* combinadas con coadyuvante son capaces de proteger contra la enfermedad. Los estudios fueron basados en las proteínas de la membrana externa de *C. ruminatum* (OMP por sus siglas en ingles) fueron identificadas proteínas homologas de MAP-1 entre estos genogrupos estas son OMP-1 para *E. chaffensis* y *E. canis* y P44 EGH que reacciona también con la proteína de 44 kDa de *E. equi* y *E. phagocytophilia*, aunque los estudios que comprueben que estas proteínas protegen contra infecciones todavía no ha sido realizados. Las respuestas inmunes inducidas con esta vacuna fueron una fuerte activación de la respuesta de anticuerpos contra proteínas inmunogénicas (MAP-1) y propició que las células producidas por la vacuna inactivada secreten interferón lo que ha probado inhibir el crecimiento de *C. ruminatum* in Vitro, y la respuesta ante la inmunización con el organismo in vivo el similar pero se dirige a los monocitos de sangre periférica.

Un método alternativo y novedoso para el control de las garrapatas en grandes especies es la vacuna antigarrapatas. El agente protector Bm86 a sido identificado a partir de los intestinos de una hembra adulta de *Boophilus microplus* y obtenida por tecnología recombinante de DNA. Las vacunas contienen este antígeno que ya ha sido lanzado al mercado y ha mostrado ser efectiva. Este concepto de vacunación antigarrapata aun no ha sido investigada en pequeños animales y el desarrollo de una vacuna contra *Rhipicephalus sanguineus* requiere investigaciones futuras (Harrus et al., 1999).

## **Coinfección**

Existen evidencias que indican que las infestaciones por garrapatas pueden resultar en la transmisión de un amplio espectro de organismos.

*Rhipicephalus sanguineus*, no solo es capaz de transmitir *E. canis* también *E. ewingii*, *Babesia canis* y *Babesia gibsoni*. Existen estudios donde se encontró que 58% de los perros diagnosticados con *E. canis* también portaban *Bartonella* la cual clínicamente causa epistaxis siendo este signo clínico considerado en campo como característico de infección por *E. canis*. Tomando en cuenta las posibilidades de coinfección la presencia de epistaxis no resulta determinante para la enfermedad de EMC pues puede ser causada por otros organismos que transmite el artrópodo. Al mismo tiempo se informó seropositividad concurrente con *Borrelia burgdorferi*. (Kidd y Breitschwerdt 2003). Existe un estudio en donde se documenta que *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. equi*, *E. ewingii* y *E. platys* pueden causar manifestaciones de enfermedad y anomalías clínicas patológicas en perros. También se demostró la primera evidencia del desarrollo de enfermedad en un perro naturalmente infectado con *E. chaffeensis*, Lo que es alarmante ya que los perros reactivos serológicamente a *E. canis* pudieran estar infectados con *E. canis*, *E. chaffeensis* o *E. ewingii* alguna o todas ellas. Las infecciones con cualquiera de los tres agentes antes mencionados, más de uno de estos o todos los anteriores pueden provocar enfermedad con manifestaciones clínico-patológicas y signos indistinguibles entre los mismos (Beeching et al., 2000).

Considerar la posibilidad de infecciones concurrentes permite diagnósticos más acertados y tratamientos exitosos.

### **Potencial zoonótico**

Históricamente se pensaba que las especies de *Ehrlichias* eran hospedador específicas, es decir; que *E. canis* solo afectaba a perros y cánidos salvajes, así como que *E. chaffeensis* solo podía infectar a venados y a humanos. Recientemente ha sido aislado y se ha encontrado a un agente genéticamente y antihigénicamente similar a *E. canis* en un humano en Venezuela (Pérez et al., 1996). También se ha encontrado a *E. risticii* que es

la causante de la fiebre de Potomac en caballos, en pacientes caninos. Existen evidencias recientes de que un miembro del grupo *E. phagocytophila* presumiblemente *E. equi* causa manifestaciones de enfermedades en humanos, gatos, perros y caballos. Más aún la infección en perros por *E. chaffeensis* ha sido identificada en estudios experimentales y de manera natural en infecciones que persisten por meses. Lo anterior sugiere que los perros pueden actuar como reservorio de *E. chaffeensis* que es causante de erliquiosis monocítica humana (EMH). Al mismo tiempo se ha detectado a *E. equi* como el agente causal de la erliquiosis granulocítica humana (EGH) y ha sido aislada en perros lo que aumenta las posibilidades de que un cánido puede fungir como reservorio de la infecciones en humanos. Adicionalmente *E. canis* y *E. ewingii* agentes comunes causantes de erliquiosis en perros pueden causar ocasionalmente infecciones en humanos (Preziosi y Cohn., 2002).

El rol de los vertebrados como reservorios de *rickettsias* continúa en discusión. El primer informe de Erliquiosis monocítica humana (EMH) fue descrito en 1986, en ese momento se pensó como causante a *E. canis*, el organismo causal fue identificado después como *E. Chaffeensis*. De cualquier modo existe un caso reciente de EMH en Venezuela y se ha acusado de responsable a una agente que asemeja más a *E. canis* que *E. chaffeensis*. *E. chaffeensis* y *E. canis* están relacionadas de manera cercana por su nivel genético (16S rNA) y antigénico lo que ha probado que los perros pueden verse afectados también por *E. chaffeensis*.

***Ehrlichia chaffeensis*:** El principal reservorio de *E. chaffeensis* es la garrapata del venado cola blanca (*Ixodes pacificus*), pero ha sido detectada en *Amblyomma americanum* y *dermacentor variabilis* (Beeching et al., 2000). Es una enfermedad moderada a severa donde el 63% de los casos requieren de hospitalización, donde el 2.7% se desencadena fatalmente. (Walker et al., 2004).

Considerando el contacto estrecho que existe entre el hombre y el perro, y los antecedentes de riesgo de zoonosis entre ambas especies resulta importante estudios acerca de la presencia de estos y otros organismos ellas.

## LITERATURA CITADA

- Abuaf, N. 2000. Neurological Síndromes Associated with Nervous System-Specific autoantibodies. Clin. Rev. Allergy Immunology. 19
- Baneth G., T. Warner, A. Koplak A., S. Weistein S., A. Keysary, 1996. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. Vet. Rec., 138(11):257-9.
- Beeching, N. J., C. A. Hart y B. I. Duerden. 2002. Tropical and exotic infections. J. Med. Microbiol. 49:5-27.
- Bélanger, M., H. L. Sorenson, M. K. France, M. V. Bowie, A. F. Barber y E. B. Bretschwerdt y A. R. Alleman. 2002. Comparison of Serological Detection methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infections in dogs J. Clin. Microbiol. 40 (9): 3506-3058.
- Bernabeu M. y F. Segura-Porta. 2005. Enfermedades producidas por *Rickettsia*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23(3):163-172.
- Botros B.A., M.S. Elmolla, A.W. Salib, C. Calamaco, G.A. Dash, R.R. Arthur, 1995. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort J. Vet. Res., 62(1):41-3.
- Branger, S., J. M. Rolain y D. Raoult. 2004. Evaluation of Antibiotic Susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by Real-Time PCR. Ant. Agents and Chemotherapy. 48 (12): 4822-4828.
- Bray, D., D. Raff y J. D. Watson. 2002. Biología molecular de la célula. 3 ed. Ediciones Omega. Barcelona.

- Breitschwerdt E. B., B. C. Hegarty y S. I. Hancock. 1994. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. Clin. Microbiology. 36 (9): 2645-2652.
- Bremer W. G., J. J. Schaefer, E. R. Wagner, S. A. Ewing, Y. Rikihisa, G. R. Needham, S. Jittapapong, D. L. Moore, R. W. Stich. 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitology. 131: 95-105.
- Bulla, C., R. K. Takahira, J. P. Araujo Jr., L. A. Trinca, R. S. Lopes y E. C. Wiedmeyer. 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. Vet. Res. 35:141-146.
- Campos S.R.E., V.E.Galindo, M.I. Preciado, B.A. Cortés, O.M. Durán, L.M. López, G.R. Lezama, D.O. Rebolledo, R. macedo, 2006. Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria Acapulco.
- Cerundolo, R., D. Capralis., L. MAnna y A. E. Gravino. 1998. Recurrent deep Hypoderma in German Shepherd dogs with underlying ehrlichioses and hypergammaglobulinemia. Vet. Dermatology. 9: 135-142.
- Chopra, I. y M. Roberts. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular biology, and epidemiology of Bacterial resistance.. Microbiology and Molecular Rev. 65: 232-260.

- Cocco R., G. Sanna, M. G. Cillara, S. Tola, L. Ximenes, M. L. Pinnaparplaglia, G. Masala. 2003. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990: 126-130.
- Cunha B. A., C. M. Silbey y A. M. Ristuccia. 1982. Doxyciclina. *Ther Drug Monit* 4(2): 115-135.
- Davoust B., J.L. Marie, S. Mercier, M. Boni, A. Vandeweghe, D. Parzy, F. Beugnet. 2003. Assay of Fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Vet. Parasitology.* 112: 91-100.
- Didier, R. y V. Roux. 1997. Rickettsioses as Paradigms of New Emerging Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Rev.* 10(4):694-719.
- Douglas, A. D., P. J. M. Leenen y R. A. Greenfield. 2004. Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria. *Clin Microbiol.* 17 (2): 323-347.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dash, G. H. Palmer, S. C. Ray, . Rikihisa y F. R. Rurangira. 2001. Reorganization of genere in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* en el order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia and Ehrlichia with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51: 2145-2165.
- Feldman E. C. and W. W. Nelson. Canine and feline Endocrinology and reproduction. Second edition. Saunders.
- Fenollar, F., y D. Raoult. 2004. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS.* 112: 785-807.

- Green, C. E. 1998. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 2 ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Penn.
- Green, C. E, 2006. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3 ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Penn.
- Harrus, S., H. Bark y T. Waner. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. 1997.  
Continuing Education. 19 (4):431-442
- Harrus, S., T. Waner, H. Bark, F. Jongejan y A. W. C. A. Cornneissen. 1999. MINIREVIEW Recent Advances in Determining the patogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 37(9): 2745-2749.
- Harrus, S., R. A. Alleman, H. Bark, S. M. Mahan y T. Waner. 2002. Comparison of three enzyme –linked inmunosorbant assays with the direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. Veterinary Mirobiology 2002. 86: 361-368.
- Hilderbrant, P. K, J. D. Conroy, A. E. McKee, M. B. A. Nyindo y D. L. Hudxsoll. 1973. Ultrasculture of *Ehrlichia canis*. Infection and Immunity. 7(2):265-271.
- Higgins, A. J., S. Radulovic, M. E. Schriefer y A. F. Azad. 1996. *Rickettsia felis*: a new Species of pathogenic Rickettsia Isolated from Cat Fleas. J. Clin. Microbiol. 34(3): 671-674.
- Jiraporn, S.t, C. Pitulle, C. A. Alvarado, K. Madrigal, S. I. Hancock y E. B. Breitschwerdt. 2001. Coinfection with Tree Ehrlichia Species in Dogs from

Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA secondary Structure. *J. Clin. Microbiol.* 39 (1): 90-93.

Kidd L. y Breitschwerdt E. B. 2003. Transmission Times and Prevention of Tick-Borne Diseases in Dogs. *Continuing education.* 25 (10): 742-748.

Labarthe N., M. de Campos Pereira, O. Barbarini, W. McKee, C.A. Colmbra, J. Hoskinns, 2003. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet Ther.*, 4 (1): 67-75.

Lorete-Mendez , C., Sainz, A., Tesouro, M., A. 2004. CD8 and CD4 lymphocyte populations in blood from healthy dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Dermatology.* 15: 41-69.

Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2004. *Biología de los microorganismos.* 10 ed. Pearson Educación, S.A., Ribiera de Loria, Madrid.

Mahan S, P. J. Kelly, S. M. Mahan. 2005. A preliminary study to evaluate the immune responses induced by immunization of dogs with inactivated ehrlichia organisms. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72 (2) : 119-128.

Mavromatis, K., C. Kuyler Doyle, A. Lykidis, N. Ivanova, M. P. Francino, P. Chain, M. Shin, S. Malfatti, F. Larimer, A. Copeland, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, X. J. Yu, D. H. Walker, J. W. McBride y N.C. Kyrpides. 2006. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal of Bacteriology.* 188 (11): 4015-4023.

- Miodrag, R., D. L. Huxsoll, R. M. Weisiger, P. K. Hildebrandt y M. B. A. Nyindo. 1972. Serological Diagnosis of tropical Canine Pancytopenia by Indirect Immunofluorescence. *Infection and Immunity*. 6 (3): 226-231.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, G. Horn y H. Erlich. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emerville, California.
- Murphy G. L., S. A. Ewing, L. C. Whitworth, J. C. Fox, A.A. Kocan. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology* 79: 325-339.
- Mylonakis M. E., A. F. Koutinas, C. Billins, L. S. Leontides, V. Kontos, O. Papadopoulos, T. Rallis, A. Fytianou. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*.91: 197-204.
- Nuñez O.L.2002. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. Congreso AMMVEPE pp: 60-66.
- Pancieria R. J., S.A. Ewing y A. W. Confer. 2001. Ocular Histopathology of Ehrlichial Infections in the Dog. *Vet Pathol*. 38: 43-46.
- Parola, P., B. Davavoust y D. Raoult. 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res*. 36: 469-492.
- Preziosi, E. D. y L. A. Cohn. 2002. The increasingly Complicated Story of *Ehrlichia*. *Continuing education*. 24 (4): 277-285.

- Pérez, M., Y. Rikihisa y B. Wen. 1996. *Ehrlichia canis*-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and genetic Characterization. *American Society for Microbiology*.34(9):2133-2139.
- Plumb, D. C. 2002. *Veterinary Drug Handbook*. 4 ed. Iowa state press. USA.
- Rikihisa, Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Rev.* 4 (3):286-308.
- Rodríguez-Vivas R.I., R.E.F. Albornoz, G.M.E. Bolio, 2004. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.*
- Roger W. S., Y. Rikihisa, S. A. Ewing, G. R. Needham, D. L. Grover y S. Jittapalapong. 2002. Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally Infected Ticks with a *p30*-Based PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 40(2):540-546.
- Ruiz, R. G. y B. F. Feldman.1998. Acquired and Inherited Platelet Dysfunction in Small Animals. *Continuing education.* 20 (9):1039-1050.
- Sainz, A., S. Delgado, I. Amusatogui, M.A. Tesouro, P. Carmenes, 1996. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leon (north-west Spain). *Prev. Vet. Med.*, 29: 1-7.
- Skotarczak, B. 2003. Canine Ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med.* 10:137-141.
- Tamece, T. K., A. R. Alleman, H. L. Sorenson, D. C. Marciano, E. B. Breitschwerdt, S. Harrus, A. F. Barbet y M. Bélanger. 2003. Characterization of the Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis* and

*Ehrlichia chaffeensis* and Its Application for serodiagnosis of Ehrlichiosis. Clinical and diagnostic laboratory Immunology. 10 (4): 520-524.

Torina A y S. Caracappa, 2006. Dog tick-borne diseases in Sicily. Parassitologia., 48(1-2):145-7.

Tinoco-Gracia L., H. Quiroz-Romero, M. T. Quintero-Martínez, T. B. Rentería Evangelista, A. Barreras-Serrano, S. Hori-Oshima, G. López-Valencia, A.R. Tamayo-Sosa, V. A. Quezada-Iñiguez, M Moro y J. Vinasco. 2007. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Dogs from Mexico-US. Border Desert Region: Pilot Study. J. Anim.Vet. Adv., 6(5): 758-760.

Walker D. H., N. Ismail, J. P. Olano, J. McBride, X. Yu y H. Feng. 2004. Ehrlichia Chaffeensis: A prevalent, Lifetheatening, Emergin Patogen. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 115: 375-384.

Zafar, I., W. Chaichanasiriwithaya y Y. Rikihisa. 1994. Comparison of PCR with other test for Early Diagnosis of canine Ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 32 (7): 1658-1662.

Zhang, Jian-zhi., M. Sinha, B. A. Luxon y X. Yu. 2004. Survival Strategy of Obligately Intracellular Ehrlichia Chaffeensis: Novel Modulation of Immune Response and Host Cell Cycles. Infection and Immunity. 72 (1): 498-507.

Skotarczak, B, 2003. Canine Ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med. 10:137-141.

## EXPERIMENTO I

Title: **Seroprevalence and traceback of animals suspected of carrying *Ehrlichia canis*, in dogs attended in veterinary clinics in Mexicali, Baja California, Mexico.**

Authors: Paulina Haro-Álvarez\*, Gilberto López-Valencia, Luís Tinoco-Gracia, Tomas Rentería-Evangelista, Gerardo Medina-Basulto.

Address: Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias,  
Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México

---

Artículo publicado en la revista: Journal of Animals and Veterinary Advances, año 2007  
# 6 (7): 850-854.

**Seroprevalence and traceback of animals suspected of carrying *Ehrlichia canis*, in dogs attended in veterinary clinics in Mexicali, Baja California, Mexico**

Paulina Haro-Álvarez\*, Gilberto López-Valencia\*, Luís Tinoco-Gracia\*,  
Tomas Rentería-Evangelista\*, Gerardo Medina-Basulto\*.

\*Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México

**Abstract**

A cross-sectional study was carried out in order to estimate the seroprevalence of antibodies against *Ehrlichia canis* as well as track patients suspected of carrying the disease. A total of 384 blood samples obtained from canine patients of 38 veterinary clinics in the urban area of Mexicali, Baja California, Mexico were randomly collected during 22 months and analyzed with ELISA Helica biosystems® commercial kit. A Traceback was carried out by doing a follow-up of 20% of the dogs that were suspected of the disease. It encompassed a revision of their medical record as well as serum analysis. Seroprevalence found reached 21.6% (83/384). From the 20% of suspect cases (15/75) the 80% (12/15) developed signs of the disease between samplings. Of these, 67% (8/12) were treated for *E. canis*, which resulted in 75% (6/8) being negative in their second sample and 25% remaining as suspected of the disease. All dogs that showed signs of the disease and did not receive treatment (3/12) became positive to *E. canis* in their second sample. Taking into account seroprevalence and the percentage of animals suspected of carrying the disease, at least 40% of the total canine population in the city out been in contact with the bacteria. Taking account of tracking parameters for suspected individuals the prevalence obtained in this study could underestimate the real seroprevalence of Canine Monocytic Erlichiosis (CME) in this region. As the disease is a zoonosis it is necessary to estimate the risk factors for its presence. Future studies that include

molecular biology are required in order to determine the presence of the etiological agent as well as the detection of other *Ehrlichia* species that show cross reaction with *E. canis*.

**Keywords:** Dogs, *E.canis*, seroprevalence, traceback

**Corresponding Author:** Ana Paulina Haro Álvarez, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, México  
haropaulina@yahoo.com.mx

## **Introduction**

Canine Monocytic Erlichiosis (CME) has been widely recognized as an important disease of canines<sup>1,2</sup>; it is a zoonosis<sup>3</sup> and is caused by a gram-positive proteobacteria from the *Ehrlichia* genus<sup>4</sup> that is transmitted by the bite of *Rhipicephalus sanguineus* tick, which has worldwide distribution. CME has a high prevalence in hot climates or in environments that favor the preproduction of the tick<sup>5</sup>, as is the case in the Mexican northwest. Serological evidence of the bacteria in this region have been reached<sup>6,7</sup> Nevertheless, the real prevalence of CME still unknown in the region. This study attempted to: 1) estimate the seroprevalence of antibodies against *Ehrlichia canis* (*E. canis*) in the Mexicali urban area, and 2) carry out a follow-up of those patients that were suspected of having the disease.

## **Materials and Methods**

### ***Time and Location***

This study was carried out from February of 2005 to October 2006 in the city of Mexicali, Baja California, Mexico, which borders with the state of California, USA to the north and is located at 32°40'0"N, 115°28'0"W. The city has an estimated

population of 653,046 <sup>8</sup> with approximately 151,000 canine pets.<sup>9</sup> Climate is dry with some showers in winter and extreme temperature variations during the year. In summer the average temperature reached 39 °C (28 to 50 °C), while in winter temperatures are around 10 °C (-2 to 18 °C). The average annual rainfall is 75 mm.<sup>10</sup>

### ***Study population and inclusion criteria***

A total of 384 patients older than one month from different breeds, as well as from both genders, were attended in 38 veterinary clinics established in the Mexicali urban area, were randomly included in this study. The number of dogs sampled from each clinic is proportional to the quantity of patients received each season. Sampling was carried out during 22 months.

### ***Sample size***

In this study, the sample size was estimated at 384 dogs. In order to determine the sample size the following parameters were considered: 1) a 50% prevalence (as the real prevalence is unknown), 2) a 95% confidence interval, and 3) a 5% error. The following formula was used to determine the sample size:  $n = \frac{[(N)(Z^2)] * [(p)(q)]}{[(N)(d^2) + ((z^2) (p)(q))]}$ ; where N is the population (151,000), Z is the confidence interval (0.95), p is the prevalence (0.50), q equals 1-p (0.50), and d<sup>2</sup> is the precision level (0.0025) <sup>11</sup>

### ***Sample collection***

Samples were collected by venipuncture of the cephalic or jugular vein that had been previously cleaned with isopropyl alcohol. A total of 3 ml of blood were collected from each patient and placed in a 5 ml plastic tube without anticoagulant and kept at 4 °C for a maximum of 7 days until their processing.

Samples were centrifuged at 3500rpm x 10 min, serum was separated from the cell pack in 1.5 ml individual vials and kept at -20 °C until serological analysis.

### ***Follow-up of suspected animals***

In order to carry out the follow up, blood samples were taken from 20% of the animals that had resulted as suspected in the initial ELISA test. Samples were processed according to the aforementioned methods. This second sampling was done within a period no greater than 21 months after the first sampling.

### ***Data collection***

Tracking was carried out by medical follow-up, including revision of medical records, of 20% of the animals that had resulted as suspected in the initial ELISA tests. Half of these patients were receiving treatment whereas the other half did not. Animals that were considered treated were those that received therapy against *E. canis* using one of the following drugs: doxycycline, tetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, minocycline, ampicillin or Imidocarb dipropionate.<sup>12</sup>

### ***Serological analysis***

The Enzyme Linked Immunosorbent Assay to detect IgG antibodies against *E. canis* using the Helica® commercial diagnosis kit (Helica Biosystems Inc.®, Fullerton, CA, USA) was the diagnostic test used following manufacturers recommendations. ELISA plates with 96 wells were used, with the first well as the negative control by placing 100 µl of serum from a patient not reactive to *E. canis* (included in the diagnostic package) and the second well as the positive control by placing 100 µl of the positive control solution (from a dog positive to *E. canis*, included in the diagnostic kit). At different stages the following solutions

were used: Buffering solution (phosphate buffered saline solution, pH 7.4 and 0.05% Tween 20, reconstituted in 1 liter of distilled water), anti-canine heavy chain IgG conjugate from rabbit labeled with horseradish peroxidase, buffered substrate tampon solution (contains urea peroxide and 3,3',5,5' tetramethylbenzidine) and a Antigen-Antibody (Ag-Ab)reaction stop solution (diluted phosphoric acid). Each serum sample was thawed at room temperature and diluted with the buffering solution to 1:100. A 100 µl of the diluted serum were placed in each well and incubated for 15 minutes at room temperature (20-25 °C). The plates were washed 4 times with the saline buffer solution, 66 µl of the conjugate were added and incubated and washed as described before. Later 66 µl of substrate solution were added and incubated for 10 minutes at room temperature, and then 66 µl of Ag-Ab stop solution were added to each well to stop the reaction. In order to compare the reaction with the positive and negative controls the plates were placed in an ELISA reading spectrophotometer with a 450 nm filter (Bio-rad® Laboratories, Hercules, CA, USA) to read the absorbency. Following manufacturer's instructions, all samples that showed an optic density equal or greater than 0.5 were considered positive, all those with values between 0.301 and 0.499 were considered as suspected to have the disease, and those with 0.300 or less were considered as negative.

### ***Data analysis***

The prevalence and confidence intervals were estimated with the formulas described by Daniel.<sup>8</sup> A chi-square test ( $X^2$ ) was used in order to assess if the presence of the disease was associated to the season. Furthermore, the odds ratio (OR) was calculated for with a 95% confidence interval. All statistical analysis were carried out in MedCalc®.<sup>13</sup>

## Results and Discussion

The Seroprevalence found reached 21.6% (83/384) to *E. canis*, while 19.5% (75/384) were suspected of carrying the disease and 58.9% (226/384) were negative to antibodies against *E. canis*. The results from the ELISA test can be found in Table 1. Seroprevalence in this study is similar to reports from other countries such as Spain, Brazil, Italy, Israel and Egypt<sup>14,15,16,17,18</sup>, although some of these reports the test used was immunofluorescence antibody (IFA).<sup>19</sup> The similarity could be due to the fact that their climate is similar to that in our region. Nevertheless, in Mexico several studies have established prevalence between 33% and 70%.<sup>6,7,20,21</sup> The differences between those studies and the present work could be due to: 1) the geographical region studied, 2) climate, 3) presence and abundance of the vector in each study region, 4) sampling duration, 5) sampling regime, 6) sample size 7) season when the studies were carried out and 8) due to include not-healthy animals. These variables are important as it has been established that the frequency of CME is related to the season in which the vector proliferates<sup>5</sup>, nevertheless, in this study no relationship between the season and prevalence could be observed, reflecting the random nature of this study (Table 3). Other studies carried out in Mexico have used Snap 3Dx® ELISA (IDEXX, USA) which uses 2 recombinant proteins specific to *E. canis* (rp30 and rp30-1) as the antigen, compared to the Helica Biosystems Inc.® which uses the whole antigen. The use of different sources of antigen can affect reactivity and in consequence affect sensitivity and specificity of the tests.<sup>17</sup> Furthermore, seroconversion only indicates the presence of antibodies, which can be explained as either 1) evidence of a past infection, 2) previous contact with the bacteria but no development of an infection, 3) presence of an active infection at the time of sampling, and 4) cross-reaction with other species such as *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, and *E. equi*, as well as other microorganisms such as *Neorickettsia helminthoeca* and *Rickettsia rickettsi*.<sup>22</sup> Therefore, seroconversion should be considered as the first step towards diagnosis of a disease caused by rickettsias.<sup>23</sup> Taking into consideration the percentage of individuals suspected of

carrying the disease (19.5%: 75/384) is similar to those that were positive, and while the presence of antibodies does not necessarily indicate that the animal has the disease,<sup>24</sup> 20% of these were followed up (15/75). The results obtained from the follow-up are shown in Table 2. The observations in the medical follow-up of this study are different from expectations because the 80% (12/15) of the animals suspected of carrying the disease showed signs of the disease between the time of the first and second sampling. This would indicate that indeed they could be infected by the bacteria at the time of the first sampling either in an acute or subclinical stage, of these who developed signs 67% (8/12) received treatment against *E. canis* with either doxycycline and/or Imidocarb dipropionate. Of those patients that were treated, 75% (6/8) were seronegative in the follow-up test indicating a successful treatment that eliminated the bacteria, and the remaining 15% (2/8) remained as suspected to have the disease which could indicate either evidence of contact with the disease, subclinical carriers of the agent or a cross reaction with another microorganism. All the dogs that had signs of the disease and did not receive treatment (3/12) resulted as seropositive to *E. canis* in the second serological test. Antibodies persisted in two of the three patients treated for the disease which could be due to the fact that in the majority of dogs antibody titers progressive decrease and patients sometimes become seronegative up to 6 or 9 months after treatment. Some patients can remain as asymptomatic carriers after treatment and retain high titers against *E. canis* for years. Therefore, it is not possible to always determine if the bacteria or antibody persist clinically in animals that have been treated. It can be assumed that the etiological agent has been eliminated when hyperglobulinemia, as well as other clinical signs and laboratory findings are progressively better after treatment.<sup>24</sup> A definitive diagnosis of the presence or absence of *E. canis* can only be done through molecular biology techniques.<sup>25,26</sup>

## **Conclusions**

Prevalence of Canine Monocytic Ehrlichiosis was 21.6% in dogs treated in veterinary clinics of Mexicali. There is no significant difference in prevalence among the seasons where the sample was taken. Due to the numerous situations when a dog can have antibodies against *E. canis*, serology should be considered as the first step towards diagnosing CME. Taking into account that 19.5% of the samples were suspected of having the disease it is suggested that approximately 40% of the canine population of the city has come into contact with the bacteria or has a cross reaction with another agent. In view of our follow-up results, the prevalence obtained in this study underestimates the real CME prevalence in this region. As the disease is a zoonosis it is necessary to estimate the risk factors for its presence. Future studies that include molecular biology are required in order to determine the presence of the etiological agent as well as the detection of other *Ehrlichia* species that show cross reaction with *E. canis*.

## **Acknowledgements**

To Dr. Alejandro Plascencia Jorquera for his help in improving this manuscript and to the Small Animal Veterinarians Association of Mexicali, A.C. who participated in the study.

## **References**

1. Preziosi, E. D. y L. A. Cohn, 2002. The increasingly Complicated Story of *Ehrlichia*. Continuing education. 24 (4): 277-285.
2. Skotarczak, B, 2003. Canine Ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med. 10:137-141.

3. Pérez, M., Y. Rikihisa y B. Wen. 1996. *Ehrlichia canis*-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and genetic Characterization. *American Society for Microbiology*.34(9):2133-2139.
4. Green, C. E, 1998. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2 ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Penn.
5. Didier, R. y V. Roux. 1997. Rickettsioses as Paradigms of New Emerging Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Rev.* 10(4):694-719.
6. Nuñez O.L.2002. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. Congreso AMMVEPE pp: 60-66.(Spanish)
7. Tinoco-Gracia L., H. Quiroz-Romero, M. T. Quintero-Martínez, T. B. Rentería Evangelista, A. Barreras-Serrano, S. Hori-Oshima, G. López-Valencia, A.R. Tamayo-Sosa, V. A. Quezada-Iñiguez, M Moro y J. Vinasco. 2007. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Dogs from Mexico-US. Border Desert Region: Pilot Study. *J. Anim.Vet. Adv.*, 6(5): 758-760.
8. Instituto nacional de Estadística Geografía e Informática INEGI 2005. <http://www.inegi.gob.mx>. Accessed May 24 2007.(Spanish)
9. Flores-Ibarra, M, G. Estrella-Valenzuela. 2004. Canine ecology and socioeconomic factors associated with dogs unvaccinated against rabies in a Mexican city across the US-Mexico border. *Prev. Vet. Med.* 62 (2): 79-87.

10. García –Cueto, R. y Dávalos G.E. 2000. Climatología Sinóptica de Mexicali. Reporte Técnico, Instituto de Ingeniería, UABC, 45 pp.(Spanish)
11. Daniel, W.W., 2002. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud, Limusa Wiley, México D.F, pp:180 (Spanish)
12. Green, C. E, 2006. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3 ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Penn.
13. MedCalc 2006 para Windows, versión 8.2.1.0, Mariakerke, Belgica.
14. Sainz, A., S. Delgado, I. Amusatogui, M.A. Tesouro, P. Carmenes, 1996. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leon (north-west Spain). Prev. Vet. Med., 29: 1-7.
15. Labarthe N., M. de Campos Pereira, O.Barbarini, W. McKee, C.A. Colmbra, J. Hoskinns, 2003. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. Vet Ther., 4 (1): 67-75.
16. Torina A y S. Caracappa, 2006. Dog tick-borne diseases in Sicily. Parassitologia., 48(1-2):145-7.
17. Baneth G., T. Warner, A. Koplak A., S. Weistein S., A. Keysary, 1996. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. Vet. Rec., 138(11):257-259.
18. Botros B.A., M.S. Elmolla, A.W. Salib, C. Calamaco, G.A. Dash, R.R. Arthur, 1995. Canine *ehrlichiosis* in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort J. Vet. Res., 62(1):41-43.

19. Harrus S., R. A. Alleman, H. Bark, S. M. Mahan y T. Waner. 2002. Comparison of three enzyme –linked immunosorbant assays with the direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology* 2002. 86: 361-368.
20. Rodríguez-Vivas R.I., R.E.F. Albornoz, G.M.E. Bolio, 2004. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.*
21. Campos S.R.E., V.E. Galindo, M.I. Preciado, B.A. Cortés, O.M. Durán, L.M. López, G.R. Lezama, D.O. Rebolledo, R. Macedo, 2006. Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria Acapulco. (Spanish)
22. Bélanger, M., H. L. Sorenson, M. K. France, M. V. Bowie, A. F. Barber y E. B. Breitschwerdt y A. R. Alleman. 2002. Comparison of Serological Detection methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infections in dogs *J. Clin. Microbiol.* 40 (9): 3506-3058.
23. Parola, P., B. Davavoust y D. Raoult. 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.* 36: 469-492.
24. Harrus, S., H. Bark y T. Waner. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. 1997. *Continuing Education.* 19 (4):431-442
25. Jiraporn, S.t, C. Pitulle, C. A. Alvarado, K. Madrigal, S. I. Hancock y E. B. Breitschwerdt. 2001. Coinfection with Tree *Ehrlichia* Species in Dogs from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA secondary Structure. *J. Clin. Microbiol.* 39 (1): 90-93.
26. Roger W. S., Y. Rikihisa, S. A. Ewing, G. R. Needham, D. L. Grover y S. Jittapalapong. 2002. Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood

and in Individual Experimentally Infected Ticks with a *p30*-Based PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 40(2):540-546.

Table 1. Results for CME using the ELISA test in dogs attended in 38 veterinary clinics in the city of Mexicali

<b>Result</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>95% CI</b>
Positive	83	21.6	17.7 – 26.0
Suspected	75	19.5	15.8 – 23.7
Negative	226	58.9	53.8 – 63.6
Total	384	100	

Table 2. Results from the follow-up of patients suspected of carrying Canine Monocytic Ehrlichiosis according to ELISA test (n = 15)

<b>Months between samples</b>	<b>ELISA<sup>a</sup></b>	<b>Signs at 1<sup>st</sup> sampling</b>	<b>Signs at 2<sup>nd</sup> sampling</b>	<b>Tx<sup>b</sup></b>	<b>Months between TX and ELISA</b>
9	Positive	No	Yes	No	-
13	Positive	No	Yes	No	-
13	Positive	No	Yes	No	-
21	Suspect	No	Yes	Yes	1
4	Suspect	No	No	No	9
23	Suspect	Yes	No	Yes	10
21	Negative	Yes	Yes	Yes	36
21	Negative	Yes	Yes	Yes	21
12	Negative	No	Yes	Yes	12
11	Negative	Yes	No	Yes	12
12	Negative	No	No	No	-
5	Negative	No	No	No	-
5	Negative	Yes	No	No	-
4	Negative	No	Yes	Yes	3
23	Negative	Yes	No	Yes	3

<sup>a</sup> Positive  $\geq 0.500$ , suspect = 0.301-0.499, negative  $\leq 0.300$ ,

<sup>b</sup>Tx = treatment with doxycycline and/or Imidocarb dipropionate

Table 3. Odds ratio (OR) between the season, and positive samples to CM

<b>Season of the year</b>	<b>Samples analyzed</b>	<b>CME positive cases (%)</b>	<b>OR</b>	<b>P value</b>
Autumn – winter	153	31 (20.2)	Ref	0.87
Spring – summer	231	52 (22.5)	NS	
Total	384	83 (21.6)		