

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA
DE *Ehrlichia spp.* EN PERROS (*Canis lupus familiaris*) DE BAJA
CALIFORNIA.**

TESIS

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

PRESENTA

KATYA MONSERRAT MEZA SILVA

DIRECTOR DE TESIS

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

JUNIO 2023

Prevalencia y Factores de Riesgo Asociados a la Presencia de *Ehrlichia spp.* en Perros (*Canis lupus familiaris*) de Baja California. Tesis presentada por Katya Monserrat Meza Silva, como requisito para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobado por el siguiente comité:

**Dr. Gilberto López Valencia
Director de Tesis**

**Dr. Sergio Daniel Gómez Gómez
Secretario**

**Dra. Ana Paulina Haro Álvarez
Sinodal**

**Dr. Enrique Trasviña Muñoz
Sinodal**

**Dr. José Carlomán Herrera Ramírez
Sinodal**

AGRADECIMIENTOS

La inspiración es una de las fuentes más hermosas de la investigación, la cual nació principalmente por mis maestros a lo largo de mi vida. A mi tutor, Dr. Gilberto López que ha sido mi mentor y amigo a lo largo del proceso de investigación, gracias por todo el apoyo académico y fraternal, su entusiasmo y conocimientos contribuyeron a mi motivación día con día.

Al Dr. Daniel Gómez por su apoyo con este trabajo, por esclarecer mis dudas y formar parte de mi motivación.

A la M en MVZ Issa García, que formó parte importante de mi inspiración para ser Patóloga Clínica Veterinaria, por su apoyo incondicional y por todos estos años de amistad.

A la Dra. Ana Paulina Haro, ella lo desconoce, pero a mí, recién ingresada a la carrera fue parte de mi inspiración a ser Médico Veterinario Zootecnista, gracias por formar parte de esta investigación.

A los laboratorios de diagnóstico de referencia que participaron en la proporción de los datos y muestras de los pacientes involucrados, gracias por permitir la divulgación.

Y a mis queridos alumnos Montserrat Pineda, Germán Castillo, Belén Moreno y mi amiga y compañera de Maestría Dayanne Pérez por formar parte del procesamiento de las muestras, por todo su apoyo e interés en el trabajo.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, pero sobre todo a mi madre, Ma. Catalina Silva Paredes, ya que sin su apoyo nada de esto pudiese ser posible, gracias por creer en mi todo el tiempo, por más descabellado que te sonara, mientras fuese lo que yo quisiese y, sobre todo, que lo disfrutara, siempre te tendría a mi lado.

A mi esposo, Ricardo Pimentel, por su comprensión, apoyo, paciencia y amor todos estos años, a veces también siendo parte de la investigación y disfrutando de esta etapa conmigo. Gracias por no permitirme flaquear y por estar al pendiente de mí siempre.

RESUMEN

Prevalencia y Factores de Riesgo Asociados a la Presencia de *Ehrlichia spp.*, en Perros (*Canis lupus familiaris*) de Baja California

Ehrlichia canis (*E. canis*) es una bacteria Gram-negativa, intracelular obligada que infecta células mononucleares desarrollando así, la erliquiosis monocítica canina (EMC). El agente es transmitido por la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*). Es una enfermedad zoonótica, de distribución mundial. Los signos clínicos son variados e inespecíficos. El objetivo del presente estudio es estimar la prevalencia y los factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp.*, en perros de Baja California. El estudio se realizó en un año con muestras sanguíneas de perros provenientes de tres laboratorios de diagnóstico veterinario de Mexicali y Tijuana. Se realizó hemograma, frotis de capa leucoplaquetaria y pruebas de ELISA. La prevalencia de la enfermedad se determinó a partir del cociente de número de casos positivos entre el número de pacientes atendidos por año. Los análisis inferenciales se realizaron con el software Statistix 9[®] aplicando la técnica de Chi cuadrada (χ^2) y se realizó un análisis univariado y multivariado. Nuestros resultados muestran una prevalencia global de 4.79%, la distribución entre municipios es de 6.3% en Mexicali y 2.5% en Tijuana. Pacientes con contacto con otros perros y presencia de garrapatas tienen mayor probabilidad de presentar la enfermedad ($p < 0.05$). En Tijuana en el 96% de los casos se presentó coinfección con *Anaplasma spp.* La trombocitopenia fue la alteración encontrada en los pacientes positivos a la enfermedad.

Palabras clave: *Ehrlichia spp.*, prevalencia y factores de riesgo.

ABSTRACT

Prevalence and Risk Factors Associated with the Presence of *Ehrlichia spp.*, in Dogs (*Canis lupus familiaris*) in Baja California.

Ehrlichia canis (*E. canis*) is an obligate intracellular Gram-negative bacterium that infects mononuclear cells, thus developing canine monocytic ehrlichiosis (CME). The agent is transmitted by the dog's brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*). Is a zoonotic disease with worldwide distribution. The clinical signs are varied and non-specific. The aim of this study is to estimate the prevalence and risk factors associated with the presence of *Ehrlichia spp* in dogs from Baja California state. The study was carried out in one year with blood samples from dogs from three laboratories of veterinary diagnostic in Mexicali and Tijuana. A complete blood cell count was performed using the impedance and manual technique. Buffy coat smears and ELISA tests were also performed. The prevalence of the disease was determined from the quotient of the number of positive cases between the number of patients attended per year. The inferential analyzes were performed with the Statistix 9[®] software applying the Chi-square technique (χ^2) and univariate and multivariate analysis was also performed. Our results show a global prevalence of 4.79%, the distribution between municipalities is 6.3% in Mexicali and 2.5% in Tijuana. Patients with contact with other dogs and animals with ticks are more likely to present the disease ($p<0.05$). In Tijuana, 96% of the cases presented coinfection with *Anaplasma spp.* Thrombocytopenia was the alteration found in patients positive for the disease.

Keywords: *Ehrlichia spp.*, prevalence and risk factors.

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Etiología.....	3
Signos clínicos.....	5
Epidemiología.....	8
<i>Prevalencia y distribución mundial</i>	8
<i>Prevalencia y distribución nacional</i>	14
<i>Factores de riesgo</i>	16
Diagnóstico.....	19
<i>Patología clínica</i>	19
<i>Serología</i>	27
<i>Molecular</i>	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
JUSTIFICACIÓN.....	33
OBJETIVOS.....	34
Objetivo general.....	34
Objetivo específico.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Localización del área de estudio.....	35
Diseño de estudio.....	35
Toma de muestra y cuestionario epidemiológico.....	36

<i>Análisis de muestras</i>	36
Base de datos.....	37
Análisis estadísticos.....	37
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	51
LITERATURA CITADA.....	52
ANEXOS.....	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Manifestaciones clínicas de perros positivos a anticuerpos de <i>Ehrlichia canis</i> en Sinaloa, México.....	7
2. Factores de riesgo asociados a <i>Ehrlichia canis</i>	18
3. Errores de evaluación serológica y soluciones sugeridas para infecciones con <i>Ehrlichia canis</i>	30
4. Prevalencia de <i>Ehrlichia spp.</i> , global y por municipio.....	39
5. Factores de riesgo asociados a la presencia de <i>Ehrlichia spp.</i> , en muestras de perros analizados en el estado de Baja California....	40
6. Factores de riesgo asociados a la presencia de <i>Ehrlichia spp.</i> en muestras de perros analizados en el estado de Baja California. Análisis multivariado.....	41
7. Casos positivos de <i>Ehrlichia spp.</i> , por municipio y coinfecciones con <i>Anaplasma spp.</i>	42
8. Alteraciones hematológicas de pacientes positivos y negativos a <i>Ehrlichia spp.</i>	44
9. Anexos.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Estadios inmaduros y maduros de <i>R. sanguineus</i> . A: larva (montada en medio de Hoyer; barra = 400 µm), B: ninfa (montada en medio de Hoyer; barra = 0.5 mm), C: hembra (barra = 1 mm), D: macho (barra = 1 mm).....	4
2. Petequias en mucosa oral debido a infección por <i>E. canis</i>	6
3. Puntos de ocurrencia de <i>R. sanguineus sensu lato</i>	9
4. Prevalencias a nivel mundial de <i>Ehrlichia canis</i>	13
5. Seroprevalencia en la República Mexicana.....	15
6. Microhematocrito. Paquete de eritrocitos, capa leucoplaquetaria (flecha) y plasma.....	20
7. Preparación de un frotis sanguíneo.....	22
8. Preparación del capilar de microhematocrito para la determinación de solidos totales con un refractómetro.....	22
9. Observación del frotis sanguíneo teñido con Wright-Giemsa a 1000x.....	23
10. Mórula de <i>Ehrlichia canis</i> en el citoplasma de un monocito en frotis sanguíneo (fotografiado a 1000x).....	25
11. Comportamiento mensual de los casos positivos de <i>Ehrlichia spp.</i>	42
12. Presencia de mórula en linfocito de <i>Ehrlichia spp.</i> en una capa leucoplaquetaria (Fotografiado en 1000x).....	72

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia canis (*E. canis*) es una bacteria Gram-negativa, intracelular obligada que infecta células mononucleares y es el agente causante primario de la erliquiosis monocítica canina (EMC). La garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) transmite *E. canis* a perros de manera transestadial e interestadial (Harrus et al., 2012).

La EMC es una enfermedad canina con distribución mundial. Inicialmente fue identificada por Donatien y Lestoquard en Argelia en 1935 y posteriormente en Estados Unidos de América al detectar a perros militares infectados que murieron de la enfermedad durante la guerra de Vietnam (Harrus y Neer, 2012).

Experimentalmente se presentan tres estadios de enfermedad: aguda, subclínica y crónica. En el estadio agudo suele presentarse fiebre, depresión, letargia, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia y sangrados. En el estadio subclínico no hay signos, por lo que pasará al estadio crónico. En el estadio crónico los signos son similares al estadio agudo con tendencia a agravarse, puede observarse pérdida de peso, debilidad y sangrados (Gutiérrez et al., 2016).

El carácter zoonótico de la enfermedad ha sido ampliamente documentado (Harrus y Neer, 2012). Pérez et al. (1996) identificaron por técnicas moleculares la presencia de *E. canis* en un paciente asintomático humano en Venezuela en 1994 y en 2006 también se reportó la enfermedad en varios pacientes humanos (Pérez et al. 2006).

Para llegar al diagnóstico, es necesario combinar la información recabada en anamnesis, signología, anormalidades hematológicas, hallazgos serológicos y moleculares (Harrus et al., 2012).

La enfermedad en perros está establecida como causa de mortalidad y morbilidad; tiene una amplia distribución en diferentes continentes como Asia, África, Europa y las Américas; Australia parece estar libre de *E. canis* (Harrus et al., 2012).

En Baja California no hay estudios epidemiológicos suficientes sobre esta enfermedad en perros. Núñez-Ochoa (2003) reportó una seroprevalencia de 70.2% (26/37) en perros atendidos en clínicas veterinarias. Haro-Álvarez et al. (2007) reportaron una seroprevalencia en Mexicali, Baja California de 21.6% (83/384) en perros atendidos en clínicas veterinarias. Recientemente, Backus et al. (2022) realizaron un estudio en San Diego, Imperial, Tijuana y Mexicali durante un periodo de octubre 2021 a mayo 2022 donde se analizaron 63 animales en Mexicali y 78 de Tijuana; se obtuvo una seroprevalencia de *Ehrlichia spp.*, 49.2 y 39.7% respectivamente.

El objetivo del presente trabajo es estimar la prevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp* en perros de Baja California.

REVISIÓN DE LITERATURA

Etiología

El género *Ehrlichia* pertenece a la familia Anaplasmataceae y contiene un número de especies patogénicas como *E. muris*, *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, todas transmitidas por garrapatas del género Ixodidae. *R. sanguineus* pertenece a este género y es considerada la garrapata más abundante en México y transmite una gran variedad de agentes, incluyendo *Ehrlichia canis*, quien es el agente causal de la erliquiosis monocítica canina (EMC), y ha sido estudiada ampliamente en México (Rodríguez y Albornoz, 2005; Sosa et al., 2013).

Desde un punto de vista etiológico, *R. sanguineus* es una especie de garrapata endofílica (adaptada a la vida en interiores), monotrófica (todos sus estadios se alimentan de las mismas especies huésped) (Figura 1), y huésped triple (cada estadio requiere un nuevo huésped para alimentarse). También puede sobrevivir en ambientes exteriores, mayormente en refugios (paredes de piedra de cal o caliza) y puede alimentarse de otros huéspedes (como el humano) a pesar de no ser su cadena trópica natural, lo que la hace una especie capaz de adoptar diferentes estrategias para sobrevivir si lo necesita. En áreas tropicales y subtropicales se presentan todo el año y en regiones templadas son más activas en los meses de junio a septiembre (Dantas-Torres, 2010).



(Dantas et al., 2010)

Figura 1. Estadios inmaduros y maduros de *R. sanguineus*. A: larva (montada en medio de Hoyer; barra = 400 μ m), B: ninfa (montada en medio de Hoyer; barra = 0.5 mm), C: hembra (barra = 1 mm), D: macho (barra = 1 mm)*.

Signos Clínicos

Los signos clínicos pueden ser agudos, subclínicos y crónicos, incluye depresión, letargia, anorexia, pérdida de peso y tendencias hemorrágicas. La epistaxis también es un hallazgo frecuente (Harrus y Neer, 2012) (Figura 2).

En el examen físico puede notarse linfadenomegalia y esplenomegalia en 20-30% de los pacientes respectivamente. También considerando que el organismo se transmite por *R. sanguineus*, puede complicarse el cuadro con co-infección por otros patógenos como *Babesia canis vogeli* y *Hepatozoon canis*. Otros hallazgos son cambios en el color y apariencia de los ojos, pueden desarrollar ceguera por hiperproteinemia, hipertensión sistémica, hifema, hemorragia subretinal, separación retinal, uveítis anterior, enfermedad retinal, corioretinitis, papilledema, hemorragia retinal, infiltrado perivascular retinal y desprendimiento de retina ampollosa. También pueden observarse signos neurológicos como resultado de meningitis, sangrado meningeal o ambos (Harrus y Neer, 2012; Gutiérrez et al., 2016).

Parashar et al. (2016) reportaron que la fiebre se observa de manera constante en todos los animales infectados (95.65%), seguido de debilidad (65.1%), anorexia (56.52%) y epistaxis (52.17%) (Cuadro 1).



(Harrus et al., 2012)

Figura 2. Petequias en mucosa oral debido a infección por *Ehrlichia canis*.

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas de perros positivos a anticuerpos de *E. canis* en Sinaloa, México.

Manifestación clínica	Positivos (N = 113)	Frecuencia (%)
Fiebre	103	91.2
Anorexia	98	86.7
Letargia	82	72.6
Depresión	96	85.0
Petequias	82	72.6
Equimosis	22	19.5
Epistaxis	80	70.8
Trombocitopenia	106	93.8

(Sosa-Gutiérrez et al., 2013)

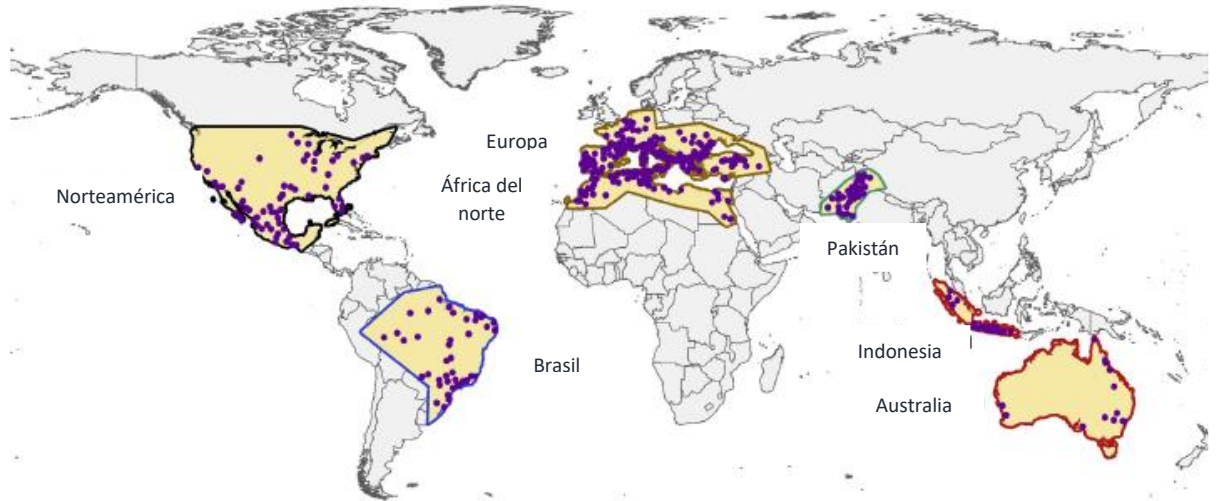
Epidemiología

Prevalencia y distribución mundial

La ocurrencia de la enfermedad se ha incrementado significativamente en diferentes regiones y coincide con la distribución de *R. sanguineus* que es mundialmente distribuida en muchas áreas urbanas en el país (Fonseca et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, Alkische et al. (2020) demostraron que la distribución geográfica de la garrapata es en el este de Estados Unidos de América, al sur de México, al norte de Sudamérica, Brasil, Europa, norte de África, países subsaharianos, Asia y Australia. Y es en estos países donde se ha encontrado más prevalente la enfermedad (Figura 3).

R. sanguineus también es conocida por transmitir otros agentes infecciosos, como babesiosis, erliquiosis, hepatozoonosis, riquetsiosis y generar co-infección (Pennisi et al., 2012). Un estudio de Punjab en India por Cabezas-Cruz et al. (2019), reportaron que la co-infección se encontró en 108 garrapatas (53%) de los cuales se presentaban con dos patógenos (80%) y 3 patógenos (20%); *E. canis* se encuentra en una gran mayoría de las coinfecciones encontradas en garrapatas (63%). Ebani (2018) reportó que, de 1026 perros examinados, 186 (18.2%) fueron seropositivos para al menos 1 patógeno (*A. phagocytophilum* o *E. canis*) y 14 (1.36%) para ambos patógenos. Bhadesiya y Modi (2015) reportaron una prevalencia de 76.74% de garrapatas en perros que estudiaron en 9 localidades de Guyarat central, India, las cuales pertenecían al género *R. sanguineus*.



(Alkische et al., 2020)

Figura 3. Puntos de ocurrencia de *R. sanguineus sensu lato*.

A pesar de ser muy reconocida como un patógeno canino, hasta hace poco Pérez et al. (1996) demostraron la detección molecular y aislamiento de *E. canis* en un paciente asintomático humano en Venezuela, en 2006 también reportaron la enfermedad en varios pacientes humanos con signos clínicos. Por esto, la enfermedad ha ganado importancia últimamente dado su potencial zoonótico.

Bouza-Mora et al. (2017) realizaron un estudio para identificar *E. canis* en sangre humana en un banco de sangre en Costa Rica, donde encontraron que el 3.6% de las secuencias de ADN con identidad alta eran correspondientes a *E. canis*. Además, el 35% de muestras analizadas por ensayo de inmunofluorescencia (IFA) resultaron positivos a *E. canis*, demostrando exposición.

La evidencia serológica y molecular nos ha permitido identificar la presencia de *E. canis* y determinar su frecuencia en todo el mundo (Salinas-Meléndez et al., 2015).

Iniciando con el continente asiático, en un estudio en Corea, perros de caza fueron más propensos a adquirir infección que perros callejeros debido a un ambiente urbano (Lim et al., 2010) sugiriendo que la prevalencia de *E. canis*, así como para otras enfermedades transmitidas por garrapatas, puede estar afectada por diferencias en la distribución del vector (Asgarali et al., 2012).

En India se realizaron diferentes técnicas de diagnóstico por observación microscópica con una prevalencia de 1.33% (03/225), dot-ELISA comercial 19.11% (43/225) y PCR 5.78% (13/225) (Mittal et al., 2017). Usando técnicas serológicas, en Punjab, India, se reporta una seroprevalencia en pacientes sospechosos de 86.9% (Kottadamane et al., 2017). Ansari-Mood et al. (2015) demostraron una baja

seroprevalencia de Mashhad al noreste de Irán con un 0.8%. En Guyarat central, India, se mostró una seroprevalencia de 54.55% (Bhadesiya y Modi, 2015).

Usando técnicas moleculares, Yogyakarta, Indonesia reportó una prevalencia molecular de 33.3% por PRC (Haryanto et al., 2020). En Tailandia se obtuvo una prevalencia de 25% de *E. canis* (Piratae et al., 2019).

En países europeos utilizando técnicas serológicas, Pantchev et al. (2015) reportaron una seroprevalencia de 21% en Bulgaria. Piantedosi et al. (2017) demostraron una seroprevalencia de 7.6% en el sur de Italia. En algunos países de Europa (Sainz et al., 2015) se obtuvieron diferentes seroprevalencias, siendo Italia (46%), Portugal (50%), Albania (50%) y Turquía (20.7%) las más prevalentes. Jurkovic et al. (2019) reportaron una seroprevalencia de 0.6 en Croacia.

En Namibia, África, se demostró una seroprevalencia de 53.8% (Manyarara et al., 2015)

En países de América del Sur, utilizando técnicas serológicas, en Mato Grosso, Brasil reportaron una seroprevalencia de 70.9% en un área pantanal de áreas urbanas y rurales (Melo et al., 2011). En Costa Rica se observó una prevalencia sérica de 18-70.7% dependiendo de la provincia y una prevalencia molecular de 0-9.8% (Barrantes-González et al., 2016).

Usando técnicas moleculares, en Río de Janeiro se obtuvo una prevalencia de 24.8% (97/390) por PCR, donde anteriormente Macieira et al. (2005) reportaron una prevalencia del 15% (Paulino et al., 2018). También reportaron una seropositividad de 24.8% de *E. canis* por PCR, en donde se muestra también la ausencia de hallazgos

clínicos y hematológicos de estos pacientes, se sugiere que el motivo es que el estadio subclínico de la EMC puede esconder la infección actual y que la misma podría ser más alta si se hubieran analizado tejidos.

En un estudio de Argentina se reportó 27.9% de prevalencia en perros de un total de 86 perros positivos a *E. canis* por PCR (Eiras et al., 2013). En la isla de San Cristóbal (Saint Kitts), reportaron una prevalencia molecular de 37% (84/227) para *E. canis*. Así mismo, se demostró una co-infección de *E. canis* y *Anaplasma platys* del 22% por inmunocromatografía (Lara et al., 2020). Al norte de Colombia se reporta una prevalencia molecular de 15.3% (Pesapane et al., 2019). Springer et al. (2018) demostraron una seroprevalencia de 62.9% (207/329) y molecular 58.5% (121/207) en perros de Nicaragua.

En Norte América, en Canadá, Villeneuve et al. (2011) reportaron una seroprevalencia muy baja (0.05%). Virginia Suksawat et al. (2000) reportaron una seroprevalencia de 2.4% en Carolina del Norte y Virginia. En Oregon y Washington, Carrade et al. (2011) reportaron una seroprevalencia muy baja de 0.04%. Hay un estudio donde se muestra la seroprevalencia de varios estados, donde el estado con mayor seroprevalencia fue en Carolina del Sur (8.8%), Arkansas (3.6%), Tennessee (2.8%), Texas (2.0%), Nebraska (1.6%), Louisiana (1.5%), Kansas y Ohio (0.9%); Maryland y Missouri (0.8%), Carolina del norte (0.7%); Florida y Virginia (0.5%); Nueva Jersey (0.4%), Alabama (0.3%) y Georgia (0.2%). Los autores refieren que la alta prevalencia está relacionada a que hay una mayor distribución de la garrapata *R. sanguineus* en esas áreas, pero a pesar de esto, la seroprevalencia mayor es para *E.*

ewingii y *E. chaffensis*, dado que la garrapata *A. americanum* se ha expandido en mayor número por estas zonas (Beall et al., 2012). (Figura 4)

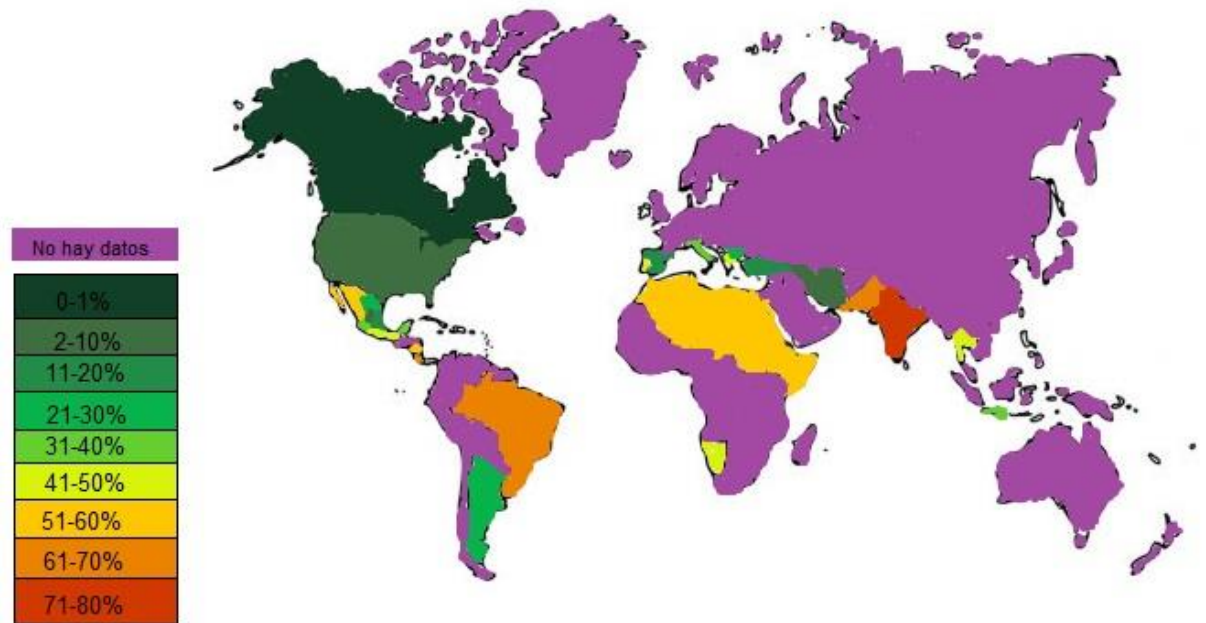


Figura 4. Prevalencias a nivel mundial de *Ehrlichia canis*.

Prevalencia y distribución nacional

En México la seroprevalencia nacional de *E. canis* es de 33.1% (793/2395), dato proveniente de 25 estados con una seroprevalencia que varía de 0 a 70.2% por estado, reportado por Núñez-Ochoa (2003). Movilla et al. (2016) dividieron la República Mexicana en zonas, la zona del noroeste (Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora) presenta una seroprevalencia de 51.04%, la zona del noreste (Coahuila y Nuevo León) con 22.9%, zona oeste (Colima, Jalisco y Nayarit) con 4.23%, zona este (Puebla, Veracruz e Hidalgo) con 37.14%, zona central norte (Aguascalientes, Guanajuato y Querétaro) con 18.05%, zona central sur (Morelos) con 15.12%, zona sureste (Quintana Roo y Yucatán) con 42.3% y zona suroeste (Chiapas y Guerrero) con 35.37 %, con un total para todos los estados mexicanos de 30.83%.

Sosa-Gutiérrez et al. (2013) reportaron una seroprevalencia en animales sospechosos del 74.5% en Sinaloa. Una prevalencia molecular de 4% fue detectada en La Comarca Lagunera, parte del desierto de Chihuahua, en los estados de Coahuila y Durango, México (Almazán et al., 2016). En Monterrey, México se reporta una seroprevalencia de 13.8 % (Salinas-Meléndez et al., 2015). En Juárez se reportó una prevalencia molecular de 47.45% en sangre, pero también se encontró positividad en tejidos de estos mismos animales, como médula ósea, bazo, hígado y ocasionalmente en linfonodo (Rodríguez-Alarcón et al., 2020). En Yucatán se estimó una prevalencia de 29.26% con PCR (Ojeda-Chi et al., 2019).

En Mexicali Baja California Tinoco-Gracia et al. (2009) reportaron que la prevalencia de *R. sanguineus* es alta (59.6%). Haro-Álvarez et al. (2007) reportaron una seroprevalencia en Mexicali, Baja California de 21.6% (83/384) (Figura 5).

Mapa de la República Mexicana



Figura 5. Seroprevalencia en la República Mexicana.

Factores de riesgo

Las condiciones que aumentan la probabilidad de adquirir EMC son diferentes según el lugar del estudio. La edad presenta una relación directamente proporcional y se determinó como un factor de riesgo con la seropositividad de *E. canis*, la cual es consistente con muchos estudios, declarando que entre más viejo sea el perro más probabilidad de exposición a vectores infectados (Pinter et al., 2008; Vieira et al., 2013). Por otro lado, Kaur et al. (2020) reportan una prevalencia de 20% de *E. canis* por PCR en perros de 0 a 6 meses y mayores de 12 años, concluyendo que puede estar presente tanto en perros cachorros y perros adultos.

Milanjeet et al. (2014) reportaron que la edad estaba asociada con la prevalencia de la enfermedad ($p < 0.001$; OR: 1.33; IC 95%), pero en el caso de sexo y raza, no hay asociación (Cuadro 2). El estudio de Lee et al. (2020), reporta que las seroprevalencias de *E. canis* en una población de perros fue significativamente mayor ($p = 0.018$) en verano (junio a agosto).

Huerto-Medina y Dámaso-Mata (2015) indicaron que existe diferencia en perros con estado malo de salud ($p = 0.016$), con acceso a la calle ($p = 0.011$), infestación con garrapatas ($p = 0.009$) y la edad ($p = 0.006$).

Navarrete et al. (2018) reportan que la presencia de garrapatas ($p = 0.0117$) es estadísticamente significativa. Diferente a otros estudios mencionados, la edad, raza, género, número de perros por casa y hábitat no presentan hallazgos relevantes.

Yuasa et al. (2012) reportaron que perros macho son más propensos a ser seropositivos a *E. canis* ($p < 0.05$) y pacientes infestados con garrapatas ($p = 0.011$).

Tanikawa et al. (2013) mostraron que pacientes en edad de 1-3 años y mayores a 3 años son más propensos a adquirir la enfermedad ($p = 0.012$).

Alberto-Carlos et al. (2011) indicaron diferencia estadística con la presencia de garrapatas contra pacientes que no presentan ($p = 0.01$). Así como también en el lugar de vivienda, en la periferia urbana ($p = 0.0002$) es significativamente mayor. Pacientes con estado de salud deficiente ($p = 0.049$) presentan diferencia estadística.

Selim et al. (2021) reportan que pacientes que viven fuera del hogar a diferencia de los que viven dentro del hogar ($p = 0.0001$) presentan una diferencia estadística. Diferente a estudios anteriores, ellos reportan que el sexo hembra ($p = 0.005$) presenta diferencia estadística. La raza Pastor Alemán también presenta una diferencia estadística a comparación de otras razas ($p = 0.03$). Y no limpiar por semana el área de estar de la mascota ($p = 0.0001$) presenta una diferencia estadística significativa.

Merino-Charrez et al. (2021) reportan en su estudio que solo el factor de la edad tuvo diferencia estadística, mostrando que perros de 1-7 años son propensos en adquirir la enfermedad. Variables como sexo, raza y época del año no fueron significativas.

Se realizó un resumen de los factores de riesgo en el siguiente cuadro (Cuadro 2).

Cuadro 2. Factores de riesgo asociados a *Ehrlichia canis*.

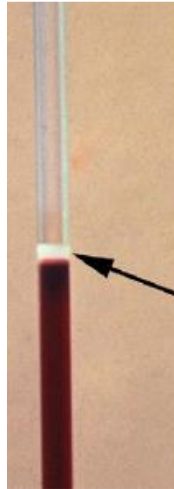
Variable	%(n)	OR	p	Lugar	Referencia
Infestación con garrapatas	80%(85) 9.6%(780)	8.5 2.08	<0.00001 <0.05	Venezuela Italia	Martínez, 2015 Piantedosi, 2017
Vivienda fuera de casa	81%(1000)	2.3	0.013	Grecia	Angelou, 2019
Desparasitación					
No recibida	29%(1000)	2.7	0.03		
6-12 m antes	5%(1000)	5.6	0.007	Grecia	Angelou, 2019
3-6 m antes	17%(1000)	5.1	0.001		
< 3 m	46%(1000)	5.6	0.0001		
Clima >15.9°C	78%(1000)	2.2	0.001	Grecia	Angelou, 2019
>1 año de edad	89%(384)	2.8	0.014	Paraguay	Pérez, 2019
>1 año de edad	59.7%(62)	9.6	<0.001	Trinidad del N	Asgarali, 2012
2-7 años	38.5%(169)	-	-	Costa Rica	Barrantes, 2016
8-15 años	52.8%(36)	-	-	Italia	Piantedosi, 2017
Atención veterinaria	88%(384)	2.7	0.012	Paraguay	Pérez, 2019
Rel. Perro/casa >3.1	55.1%(69)	2.0	0.001	Costa Rica	Barrantes, 2016
Área rural	34%(184)	-	0.0001	Brasil	Paulino, 2018

Diagnóstico

Patología clínica

En el área de patología clínica existen diversas técnicas para la evaluación sanguínea de diferentes especies animales que apoyan el diagnóstico de *E. canis* y el estado de salud general de los pacientes. Las técnicas hematológicas manuales requieren mezclado de sangre para la medición hematológica, hematocrito por centrifugación, estimación de proteínas plasmáticas por refractometría, instrumentos para el conteo de células, preparación de frotis sanguíneos y el conteo diferencial leucocitario. Para el mezclado sanguíneo se requiere una muestra de sangre, debidamente conservada en tubo con EDTA. El hematocrito es evaluado con tubos de 75 x 1.5 mm (tubos de microhematocrito), cera selladora, microcentrífuga y un lector (Thrall et al., 2012).

Para el mezclado sanguíneo se requiere una muestra de sangre, debidamente conservada en tubo con EDTA. El procedimiento es llenar un capilar con nuestra muestra sanguínea previamente mezclada, posicionada horizontalmente, conectado la superficie de la sangre del tubo con el capilar, la cual se llenará por capilaridad, llenarlo aproximadamente 70-90% de su totalidad. Se mantiene el tubo horizontalmente para evitar derramar la sangre y se procede a sellar uno de los polos del tubo capilar presionando contra la cera varias veces. El tubo capilar sellado se deposita en la microcentrífuga. Una vez centrifugada durante 3 minutos, las diferentes capas de la sangre se observan: el plasma, una línea intermedia blanquecina llamada capa leucoplaquetaria y el paquete eritrocitario (hematocrito) respectivamente (Thrall et al., 2012) (Figura 6).



(Thrall et al., 2012)

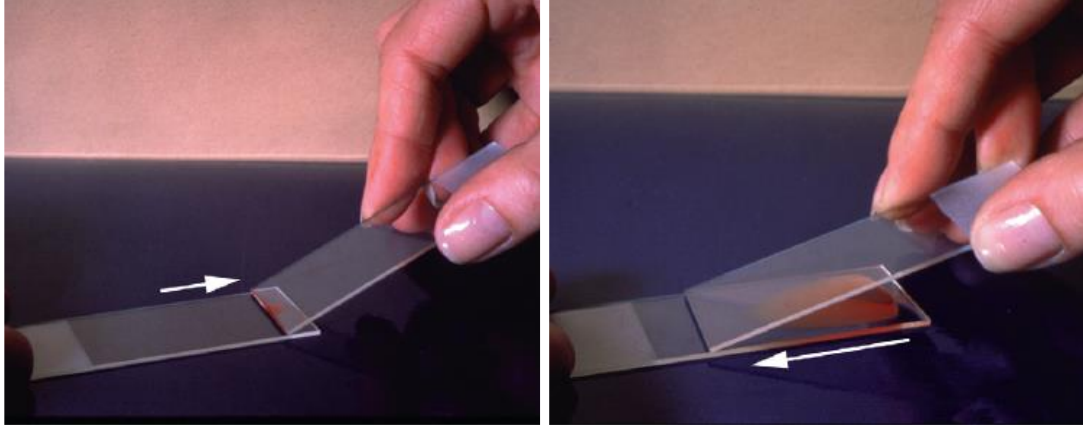
Figura 6. Microhematocrito. Paquete de eritrocitos, capa leucoplaquetaria (flecha) y plasma.

Las proteínas plasmáticas son determinadas usando el plasma y el refractómetro. El fundamento del refractómetro es que los solutos refractan (o doblan) la luz que pasa a través del fluido, en un grado que es proporcional a la concentración del soluto. El principio o propiedad que se mide es el índice de refracción relativo al agua destilada (Figura 7).

El frotis requiere de ciertas habilidades, la técnica más utilizada es la de depositar una gota de sangre cerca del límite de una laminilla y con otra laminilla tocar la gota y apoyar sobre la misma en una angulación de 30-45°, se empuja la muestra de sangre hasta el final de la laminilla en sentido contrario, la cual requiere que sea un movimiento rápido (Thrall et al., 2012; Stockham and Scott, 2013) (Figura 8).

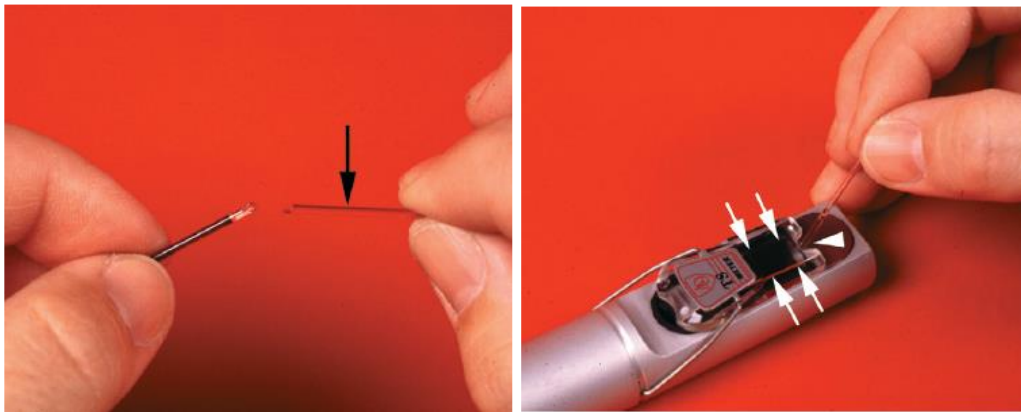
Para teñir la laminilla se requieren de tinciones tipo Wright y hemocolorante rápido. Los frotis teñidos presentan una anatomía, el borde, el área de conteo y el cuerpo del frotis. En el área de conteo se realiza un diferencial leucocitario de 100 células, se observa morfología eritrocitaria y la búsqueda de agentes infecciosos (Thrall et al., 2012; Rodríguez-Vivas et al., 2014) (Figura 9).

Las técnicas más utilizadas son la determinación por conteo y tamaño celular (partícula). La impedancia (conteo electrónico) o llamado también tecnología de Coulter, su fundamento es que las células están suspendidas en un medio electrolítico, como un medio salino, el cual es un buen conductor. Sin embargo, las células son relativamente pobres para conducir electricidad, por lo tanto, estas células impiden la habilidad del medio para conducir la corriente en una zona de detección conocida como una apertura.



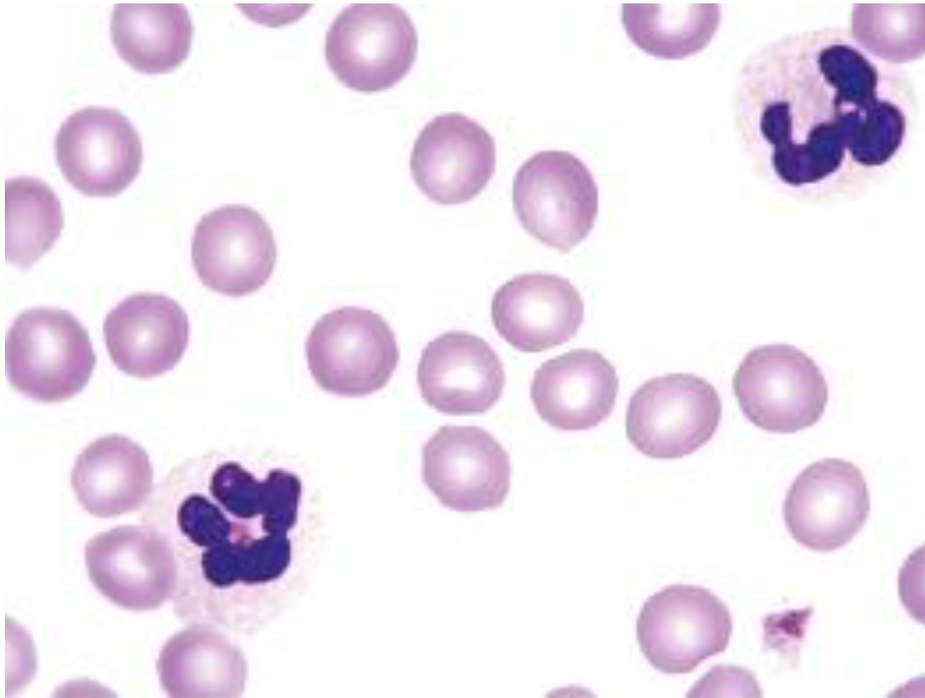
(Thrall et al., 2012)

Figura 7. Preparación de un frotis sanguíneo.



(Thrall et al., 2012)

Figura 8. Preparación del capilar de microhematocrito para la determinación de sólidos totales con un refractómetro.



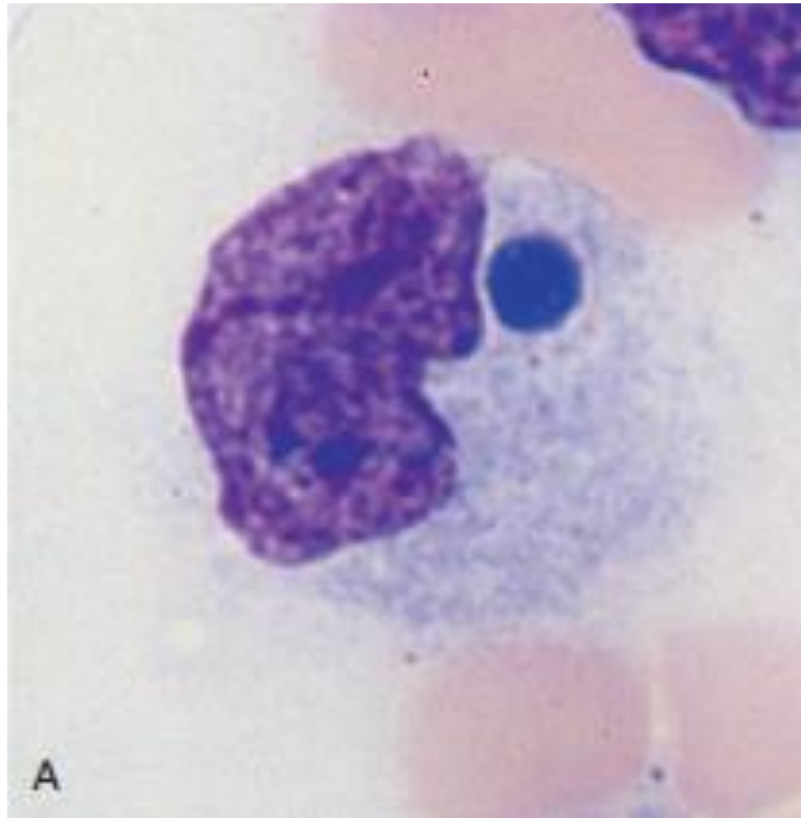
(Harvey, 2012)

Figura 9. Observación del frotis sanguíneo de un perro teñido con Wright-Giemsa a 1000x.

El tamaño de la célula es proporcional a la desviación de la corriente, esta misma ayuda a discriminar eritrocitos, plaquetas y parcialmente diferenciar leucocitos (Thrall et al., 2012).

Para la enfermedad de *E. canis* la revisión del frotis es muy importante, los monocitos son observados en busca de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (mórulas). Esta técnica resulta rápida, sencilla y económica; sin embargo, aproximadamente solo el 4% de los casos agudos de la EMC es posible demostrar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de *E. canis* (Harrus y Warner, 2011). La mejor forma de detectar *E. canis* en frotis sanguíneos es mediante el uso de capa leucoplaquetaria. Mylonakis et al. (2003) demostraron que al usar capa leucoplaquetaria en frotis sanguíneos encontraron un 66% de sensibilidad de encontrar mórulas (Figura 10).

Piratae et al. (2019), realizaron un estudio en donde se analizaron los hallazgos hematológicos de pacientes enfermos con *E. canis* y se observó anemia en la mayoría de los casos, pero relacionado a la co-infección con *A. platys* la anemia es mucho más severa (promedio de perros infectados con *E. canis* 29.62%, promedio de co-infección 26.94%). En otro estudio el promedio de los valores de hematocrito en pacientes enfermos de EMC fue ligeramente más baja que en pacientes sanos ($p < 0.05$). Ybañez et al. (2016) reportaron una gran proporción de pacientes con trombocitopenia y anemia (72.14% y 53.4% respectivamente), que es hallazgo característico de hipoplasia medular, considerándolos como marcadores de EMC (Martínez et al., 2015).



(Harrus et al., 2012)

Figura 10. Mórula de *Ehrlichia canis* en el citoplasma de un monocito en frotis sanguíneo (fotografiado a 1000x).

Los pacientes con hematocrito menor a 15% (0.15 L/L) fue observado en mayor proporción en animales enfermos con EMC ($p < 0.05$). No se encontró diferencia estadística entre animales enfermos y su asociación con el grado de trombocitopenia (Kaewmongkol et al., 2017). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas sobre la presencia de valores relativos ($p = 0.140$) ni absolutos ($p = 0.165$) de linfocitos en perros con signos clínicos (Villaescusa et al., 2012).

Asgarali et al. (2012) reportaron que una disminución del conteo plaquetario y un aumento en las proteínas séricas fueron predictores independientes de seropositividad. El conteo plaquetario disminuyó por debajo de los intervalos de referencia en 80.4% de perros seropositivos a *E. canis* y en 54.9% de pacientes seronegativos, con un OR de 3.34. 68% de seropositivos y 29.4% de seronegativos tenían incremento de proteínas séricas totales con un OR de 5.17. La trombocitopenia se atribuye al proceso de vasculitis (consumo), destrucción inmunomediada, secuestro y mielosupresión (Lara et al., 2020).

Escribano et al. (2017) reportaron un incremento de la expresión de dos proteínas: haptoglobina y α -glicoproteína ácida, y una disminución en la expresión de albúmina. Se demostró que hay cambios significativos en proteínas de fase aguda, como la haptoglobina en pacientes seropositivos con o sin signos clínico-patológicos relacionados con erliquiosis que en perros sanos.

En otro estudio se observó que los frotis de sangre teñidos y el uso de microscopía convencional solo se detectaron mórulas de *E. canis* en 3/225 casos de perros, lo cual lo hace una técnica poco sensible para confirmar el diagnóstico de erliquiosis canina. Además, se observó que la prevalencia fue baja ya que en fase crónica las células infectadas en circulación periférica suelen ser muy bajas. Se considera que la sensibilidad pudiese aumentar hasta cierto punto examinando capa leucoplaquetaria (Mittal et al., 2017). Kottadamane et al. (2017) observaron mórulas en 12/84 (14.28%) de los pacientes en monocitos.

Serología

El método ensayo inmunofluorescencia indirecta (IFA), se basa en anticuerpos específicos monoclonales o policlonales que son conjugados a un colorante fluorescente (fluorocromos) y pueden visualizarse usando un microscopio fluorescente, fluorómetro, escáner fluorescente o citometría de flujo. Los fluoróforos se excitan por la luz a una longitud de onda específica y liberan energía extra emitiendo luz a otra longitud de onda más grande. Cuando un anticuerpo específico de especie secundario se marca con un fluoróforo en lugar del primario, el método se llama IFA (Koivunen et al., 2006).

El estudio de anticuerpo inmunofluorescencia indirecta para anticuerpo IgG anti-*E. canis* misma que es considerada la prueba de oro para su detección, indicando la exposición de *E. canis*. El anticuerpo IgM no se considera un indicador de confianza, dado el desarrollo inconsistente de IgM en el curso de la enfermedad. En contraste, títulos de IgG >1:40 son considerados positivos a exposición de *E. canis*.

Para confirmar infecciones agudas es recomendable realizar dos estudios de IFA consecutivos en lapsos de 7-14 días, y un incremento de 4 veces en títulos de anticuerpos es sugerente de una infección activa (Harrus y Waner, 2011).

En el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) las moléculas enzimáticas se conjugan con anticuerpos secundarios (detección), que se unen a un complejo primario antígeno-anticuerpo. Cuando se añade el sustrato apropiado, la enzima cataliza la producción de un producto final teñido, que puede ser visualizado o cuantificado (Koivunen et al., 2006).

La detección de anticuerpos IgG de *E. canis* están disponibles comercialmente. La variable ELISA basado en una proteína 2 recombinante mayor antigénica (rMAP2), el inmunocomb dot-ELISA que usa un extracto erliquial crudo y el SNAP 3Dx que usa péptidos sintéticos derivados de las proteínas mayores inmunodominantes P30 y P30-1. La especificidad y sensibilidad del rMAP2, inmunocomb y de SNAP 3Dx es de 97%, 98% y 100% respectivamente (Harrus y Waner, 2006).

En un estudio experimental, los pacientes con *E. canis* tuvieron anticuerpos detectables a partir de los 24 días en promedio, llega a niveles pico en aproximadamente 100 días hasta el término del estudio (Gaunt et al., 2010).

Bélanger et al. (2002) realizaron una comparación serología entre diferentes métodos diagnósticos para *E. canis*, determinando así para ELISA rMAP2 un 96.2% de sensibilidad, 97.7% de especificidad con una precisión de 97%; Dip-S-Ticks una sensibilidad de 100%, especificidad de 61.4% con una precisión de 85.1%; Combo Snap una sensibilidad de 64.2%, especificidad de 97.7% con una precisión de 82.9%

y Snap3Dx una sensibilidad de 79.2%, especificidad de 100% con una precisión de 89.8%.

Molecular

El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la detección de mutaciones patogénicas en muestras de ADN y ARN para detectar, diagnosticar, subclasificar, pronosticar, monitorear la respuesta a una terapia y diagnosticar enfermedades hereditarias (Debnath et al., 2010). Detectar de manera temprana la enfermedad con la técnica de PCR antes de la producción de anticuerpos tiene mayor sensibilidad, ya que indica que la infección se encuentra activa. Lo anterior puede permitir al clínico tener un mejor monitoreo del tratamiento (Harrus y Waner, 2011).

Con frecuencia, la prueba detecta *E. canis* dentro de 4 a 10 días del periodo de incubación y antes de que ocurra la seroconversión. Pueden obtenerse resultados falsos negativos obtenidos por dificultades en la extracción del ADN del organismo, problemas en las técnicas empleadas y una selección de muestras inapropiadas. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Errores de evaluación serológica y soluciones sugeridas para infecciones con *E. canis* en perros.

Estudio	Nivel bajo significativo de seroreactividad	Razones de falsos positivos	Razones de falsos negativos	Opciones sugeridas para resolver resultados falsos
SNAP 4Dx	>160	Exposición/infección a <i>E. chaffeensis</i> o <i>E. ewingii</i>	Nivel de anticuerpos menor a 160	Realizar IFA Realizar PCR
IFA	Generalmente es mayor o igual a 64 (varía según el laboratorio)	Exposición/infección a <i>Neorickettsia helminthoeca</i> , <i>E. ewingii</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Infección temprana, niveles menores a 64	Títulos mayores a 2048 compatible con <i>E. canis</i> Realizar SNAP 4Dx para eliminar todos los patógenos excepto <i>E. ewingii</i> PCR gen-específico
PCR de sangre completa	Determina genéticamente cual especie está presente. Cuantitativo (tiempo real) puede ayudar a monitorear tratamiento	Contaminación en muestra, amplificación inespecífica	Extracción inapropiada, problema en la técnica, selección de muestra inapropiada, nivel bajo de infección, tratamiento previo	Realizar PCR de bazo Realizar PCR en tiempo real

(Adaptado de Harrus et al., 2012)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EMC es una enfermedad infecciosa canina de distribución mundial. El carácter zoonótico de la enfermedad ha sido ampliamente reportado en diferentes países, desde casos aislados en humanos y en bancos de sangre donde se encontró la presencia del agente de EMC; *E. canis* ha generado un gran interés también por su característica de patógeno reemergente (Bouza-Mora et al., 2017; Pérez et al., 2006).

La enfermedad en perros está establecida como causa de mortalidad y morbilidad y tiene una amplia distribución en diferentes continentes como Asia, África, Europa y las Américas; Australia parece estar libre de *E. canis* (Harrus et al., 2012).

Los factores de riesgo más reportados coinciden en que la historia de infestación de garrapatas en el perro, acceso a la calle y edad de los pacientes mayores a 1 año como los más propensos a adquirir la enfermedad (Pinter et al., 2008; Vieira et al., 2013; Piantedosi et al., 2017).

En México la seroprevalencia nacional de *E. canis* en perros es de 33.1% (793/2395).

Para Baja California, un estudio reportó una seroprevalencia de 70.2% (26/37) (Núñez-Ochoa, 2003). Movilla et al. (2016) dividieron la República Mexicana en zonas, donde la zona del noroeste (Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora) presenta una seroprevalencia de 51.5%, siendo ésta una de las más altas en su estudio comparado con las demás zonas.

Haro-Álvarez et al. (2007) reportaron una seroprevalencia en Mexicali, Baja California de 21.6% en perros (83/384). Recientemente, Backus et al. (2022) realizaron un estudio en 4 localidades (San Diego, Imperial, Tijuana y Mexicali) durante un periodo de octubre 2021 a mayo 2022 donde se analizaron 63 animales en Mexicali y 78 de Tijuana; se obtuvo una seroprevalencia de *Ehrlichia spp.*, 49.2 y 39.7% respectivamente.

La garrapata *R. sanguineus*, quien transmite *E. canis* es el vector más común presente en Baja California. En la ciudad de Mexicali, Baja California Tinoco-Gracia et al. (2009) reportaron que la prevalencia de *R. sanguineus* es alta (59.6%). En un censo de mordedura por garrapata realizado en el año 2016 por la Secretaría de Salud del Estado, en humanos se registra un 61% de casos en Mexicali, 22% en Tijuana y 17% en Ensenada.

En Baja California existen solo existen tres artículos donde se reporta la presencia de esta enfermedad en poblaciones caninas (Núñez-Ochoa, 2003; Haro-Álvarez et al., 2007; Backus et al., 2022). Sin embargo, debido a los criterios de inclusión que se utilizaron en estos trabajos no es posible inferir sobre las cifras de prevalencia en la población de la cual provienen las muestras. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer la prevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp.*, en Baja California en muestras de perros analizadas por laboratorios de diagnóstico veterinario de referencia en los municipios de Mexicali y Tijuana.

JUSTIFICACIÓN

La EMC se considera una enfermedad endémica en México y su importancia radica en la amplia distribución del vector que es la garrapata en la República Mexicana.

En Baja California se ha reportado una seroprevalencia de 70.2% en perros en el 2003. Sin embargo, en dicho reporte no se especificaron los criterios de inclusión ni los municipios donde aplicaron el muestreo; además solo analizaron 37 perros. En el caso de Mexicali solo se ha reportado tres estudios (2007, 2014 y 2022) sobre la prevalencia de esta enfermedad en diferentes poblaciones caninas; sin embargo, no existen estudios suficientes, ni actualizados sobre el comportamiento de la prevalencia y factores de riesgo asociados a esta enfermedad en el estado.

Considerando que esta enfermedad es zoonótica; que el perro es un animal de compañía que está en contacto directo con sus dueños y que es el principal hospedero del vector; existe el riesgo de zoonosis por mordedura de garrapata en humanos y la posibilidad de enfermar por EMC.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer la prevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp.*, en Baja California en muestras de perros analizadas por laboratorios de diagnóstico veterinario de referencia en los municipios de Mexicali y Tijuana.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estimar la prevalencia, distribución y factores de riesgo asociados a la infección de *Ehrlichia spp.*, en muestras sanguíneas de perros analizadas en laboratorios de diagnóstico veterinario de los municipios de Mexicali y Tijuana de Baja California.

Objetivos específicos

Determinar la prevalencia de *Ehrlichia spp.*, en muestras sanguíneas de perros analizadas en laboratorios de diagnóstico veterinario de los municipios de Mexicali y Tijuana de Baja California.

Conocer la distribución de la infección con *Ehrlichia spp.*, en perros de los municipios de Mexicali y Tijuana en Baja California.

Identificar factores de riesgo relacionados con la presencia de *Ehrlichia spp.*, en muestras de perros analizados en laboratorios de diagnóstico veterinario de los municipios de Mexicali y Tijuana de Baja California.

Comparar las alteraciones hematológicas de pacientes positivos y negativos a *Ehrlichia spp.*, en perros de los municipios de Mexicali y Tijuana de Baja California.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El estudio se realizó a partir de muestras sanguíneas de perros analizadas en tres laboratorios de referencia de diagnóstico veterinario ubicados en los municipios de Mexicali y Tijuana de Baja California.

Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio epidemiológico seccional cruzado durante un periodo de 12 meses (septiembre 2021-agosto 2022), todas las muestras sanguíneas de perros domésticos de Baja California provenientes de tres laboratorios de diagnóstico veterinario (Mexicali y Tijuana) fueron analizadas con el fin de identificar casos positivos de *Ehrlichia spp.* Se utilizaron pruebas en paralelo de frotis sanguíneo para identificar mórulas y ELISA (IDEXX® Snap 4DX plus, la cual detecta anticuerpos contra *Ehrlichia canis/Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma platys/Anaplasma phagocytophilum* y *Dirofilaria immitis*). Fueron incluidas en el estudio todas las muestras con un mínimo de 0.5 mL de sangre de perros sin hemólisis, y, sin importar raza, sexo, edad y condición de salud remitidas para hemograma o Snap 4DX en cualquiera de los laboratorios anteriormente mencionados. Se excluyeron todas aquellas muestras que no presentaron estas características. Se consideraron casos positivos aquellos en que se identificó la mórula de *Ehrlichia spp.* en el frotis o que hubieran resultado positivos en la prueba de ELISA.

Toma de muestra y cuestionario epidemiológico

Cada animal incluido en el estudio fue atendido en una clínica veterinaria donde se le realizó un examen físico general, seguido de la toma de muestra sanguíneas que fueron colectadas en tubos BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA con cantidad mínima de 0.5 mL de sangre. Se rotularon con el nombre del paciente y clínica veterinaria y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Además, por medio de un cuestionario epidemiológico se recabaron los siguientes datos tales como: Localización (Tijuana o Mexicali), fecha de atención, raza (según la clasificación de la Federación Canófila Mexicana, en caso de no presentar las características de una raza en particular fue descrita como mestiza), sexo (hembra o macho), edad (en meses), presencia de garrapatas (si o no) y contacto con otros perros (si o no). Además, en todos los animales se recabó información de otros análisis de laboratorio complementarios tales como: hematocrito, linfocitos, neutrófilos, plaquetas y sólidos totales. Se revisaron capas leucoplaquetarias para la búsqueda de mórulas y plas o suero para realizar las pruebas de ELISA.

Análisis de muestras

Las muestras fueron analizadas mediante las técnicas manuales (microhematocrito, refractometría, frotis y conteo por pipeta de Thoma) y técnica de impedancia (equipo de hematología). Se revisaron frotis para el estudio diferencial de leucocitos, además de descartar o confirmar la presencia de hemoparásitos y mórulas. Así mismo para incrementar la sensibilidad de la búsqueda de mórulas, se realizaron

frotis de capa leucoplaquetaria, se tiñeron con tinción hemocolorante rápida (metanol, eosina y policromo), los tiempos pueden variar según el tiempo de uso y se revisaron al microscopio óptico binocular.

Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 5,000 rpm, se separó el plasma con una pipeta de transferencia (0.5 mL) y capa leucoplaquetaria (mínimo 0.1 mL) y se transfirieron en tubos Eppendorf® de 1mL, se rotularon con el nombre del paciente y número de identificación. Estas muestras fueron resguardadas en congelación para posteriormente realizar las pruebas de ELISA. La prueba de ELISA (IDEXX® 4DX Snap plus) detecta la presencia de anticuerpos de *E. canis*/*E. ewingii*, y presenta una sensibilidad de 97.6% y especificidad 99.0%.

Base de datos

Se diseñó una base de datos en un programa de Excel para la captura y manejo de la información generada en el estudio. Algunas de las variables recopiladas fueron: ciudad de procedencia, sexo, edad, acceso a la calle, garrapatas presentes y contacto con otros perros.

Análisis estadísticos

La prevalencia de la enfermedad se determinó a partir del cociente del número de casos positivos de acuerdo con la prueba de ELISA y fórmula entre el número de pacientes atendidos por año. Los análisis inferenciales se realizaron con el *software* Statistix 9® aplicando la técnica de Chi cuadrado (χ^2) para determinar si la enfermedad

está asociada estadísticamente a los factores de riesgo evaluados. Además, con el fin de estimar la magnitud de asociación se calculó el OR (Odds Ratio) con intervalos de confianza del 95%. Así mismo, para determinar los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad, se utilizó un modelo de regresión logístico-binomial y un valor de $p < 0.10$ para confirmar la significancia. Como variable dependiente se consideraron los casos positivos de *Ehrlichia spp.*, y como variables independientes: ciudad de procedencia, sexo, edad, acceso a la calle, garrapatas presentes y contacto con otros perros. Con el fin de identificar diferencias estadísticas entre las alteraciones hematológicas de pacientes positivos y negativos a *Ehrlichia spp.*, se realizó la prueba estadística de *t de student* donde valores de $p \leq 0.05$ fueron significativos.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 5469 muestras de perros que llegaron a los laboratorios en cuestión. La prevalencia global fue de 4.79% (262/5469) y la distribución entre municipios fue de 6.3% (206/3269 en Mexicali y 2.5% (56/2200) en Tijuana. Las prevalencias entre Mexicali y Tijuana fueron evaluadas y se identificaron diferencias ($p < 0.05$) entre estos, donde los perros de Mexicali presentaron 2.57 veces mayor riesgo de presentar la infección comparado con Tijuana (OR: 2.57, IC 95%: 1.91-3.47) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Prevalencia de *Ehrlichia spp.*, global y por municipio.

Variable	No. de animales	Positivos	% de Infección	OR	95% IC	<i>p</i>
Ciudad						
Mexicali	3269	206	6.3	2.57	1.91 – 3.47	0.00001
Tijuana	2200	56	2.5			
Global	5469	262*	4.79			

*149 fueron positivos a mórulas; 8 a mórula y ELISA y; 105 a ELISA.

Otros factores de riesgo asociados fueron: 1) La presencia de garrapatas, que presentó 1.78 veces más probabilidad de presentar la enfermedad (OR: 1.78, IC 95%: 1.14-2.78); 2). Los perros que tienen contacto con otros perros presentaron 1.86 veces mayor probabilidad de ser afectados con *Ehrlichia spp.* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp.*, en muestras de perros analizados en el estado de Baja California.

Variable	No. de animales	Positivos	% de Infección	OR	95% IC	p
Ciudad						
Mexicali	3269	206	6.3	2.57	1.91 – 3.47	0.00001*
Tijuana	2200	56	2.5			
Acceso a calle						
Sí	109	8	7.3	1.59	0.77 – 3.31	0.21
No	5360	254	4.7			
Garrapatas presentes						
Sí	290	23	7.9	1.78	1.14 – 2.78	0.01*
No	5179	239	4.6			
Contacto con otros perros						
Sí	744	57	7.6	1.86	1.37 – 2.52	0.0001*
No	4679	200	4.2			
Sexo						
Hembra	2911	141	4.8	1.04	0.80 – 1.34	0.78
Macho	2414	113	4.6			
Edad						
Menor de 1 año	1062	57	5.3	1.16	0.86 – 1.57	0.32
Mayor de 1 año	4406	205	4.6			

IC= Intervalo de Confianza; OR= Odds ratio; p= valor de probabilidad. *p < 0.05

El cuadro 6, presenta los factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp.* en muestras de perros analizados en el estado de Baja California utilizando un análisis multivariado, donde solo la procedencia del perro fue significativa (p=0.00001) presentándose 2.43 veces más casos de *Ehrlichia spp.* en Mexicali que en Tijuana.

Cuadro 6. Factores de riesgo asociados a la presencia de *Ehrlichia spp.* en muestras de perros analizados en el estado de Baja California. Análisis multivariado.

Variable	No. de animales	Positivos	% de Infección	OR	95% IC	p
Ciudad						
Mexicali	3269	206	6.3	2.43	1.76 – 3.35	0.00001*
Tijuana	2200	56	2.5			
Acceso a calle						
Sí	109	11	10	1.15	0.53 – 2.51	0.72
No	5360	251	4.6			
Garrapatas presentes						
Sí	290	23	7.9	1.17	0.72 – 1.89	0.52
No	5179	239	4.6			
Contacto con otros perros						
Sí	744	57	7.6	1.35	0.97 – 1.86	0.07
No	4679	200	4.2			
Sexo						
Hembra (1)	2911	141	4.8	1.07	0.83 – 1.39	0.58
Macho (2)	2414	113	4.6			
Edad						
Menor de 1 año	1062	70	6.5	1.10	0.81 – 1.51	0.53
Mayor de 1 año	4406	192	4.3			

IC= Intervalo de Confianza; OR= Odds ratio; p= valor de probabilidad. * $p < 0.05$

La figura 11, presenta el comportamiento mensual de los casos positivos a *Ehrlichia spp.*, por municipio; donde se puede observar que en Mexicali en el mes de septiembre se presenta una gran cantidad de casos siguiendo con una disminución progresiva hasta el mes de mayo cuando se aprecia una elevación del número de casos (brote) que termina hasta agosto.

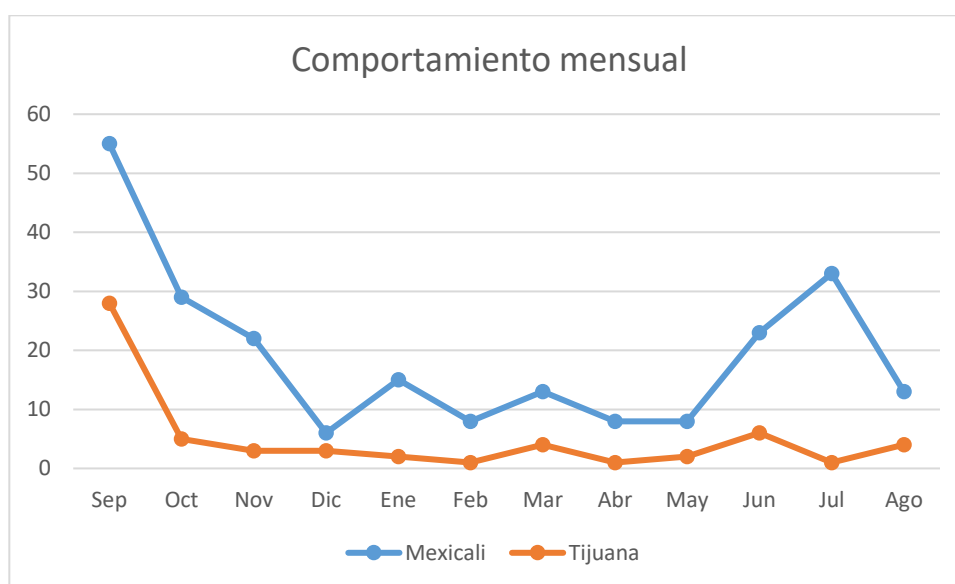


Figura 11. Comportamiento mensual de los casos positivos a *Ehrlichia spp.*

El 96% (54/56) de los casos de *Ehrlichia spp.*, identificados en el estudio, presentaron coinfección con *Anaplasma spp.*, se destaca que todos los casos de coinfección se presentaron en el municipio de Tijuana (Cuadro 7).

Cuadro 7. Casos positivos de *Ehrlichia spp.*, por municipio y coinfecciones con *Anaplasma spp.*

Municipio	N	Positivas a <i>Ehrlichia spp.</i>	Prevalencia	Coinfección con <i>Anaplasma (%)</i>
Mexicali	3269	206	6.3%	0
Tijuana	2200	56	2.5%	54 (96%)
Global	5469	262	4.79%	

Con el fin de evaluar el comportamiento de algunos indicadores hematológicos entre casos positivos y negativos a *Ehrlichia spp.*, adicionalmente se evaluaron: el hematocrito, neutrófilos, linfocitos, plaquetas y sólidos totales. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las variables, únicamente para el hematocrito no se presentó diferencia estadística. En los casos positivos los neutrófilos presentan neutrofilia, los linfocitos se encuentran en linfopenia y las plaquetas presentaron trombocitopenia. En el caso de los sólidos totales, estos permanecen en valores normales (Cuadro 8).

Cuadro 8. Alteraciones hematológicas de pacientes positivos y negativos a *Ehrlichia spp.*

Hallazgos	Positivos					Negativos					p	Intervalos de Referencia*
	N	Media	DE	Min	Max	N	Media	DE	Min	Max		
Hematocrito	260	0.35	0.10	0.08	0.65	5188	0.41	0.09	0.02	0.73	0.16	0.37-0.55 L/L
Neutrófilos	260	10.53	16.69	0.10	244	5195	10.16	9.44	0.10	181	<0.01	3.0-11.5 x10 ⁹ /L
Linfocitos	262	1.80	1.90	0.00	12.00	5207	2.30	7.02	0.00	341.40	<0.01	1.0-4.8 x10 ⁹ /L
Plaquetas	262	118.07	117.67	8.00	520	5203	279.34	148.79	0.00	1369	<0.01	200-600 x10 ⁹ /L
Sólidos totales	260	73.60	17.49	30.00	165.00	5199	75.70	12.35	16.00	142.00	<0.01	60-75 g/L

*Núñez-Bouda (2007).

DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer reporte en Baja California que informa la prevalencia y distribución de *Ehrlichia spp.*, analizando una mayor cantidad de perros y municipios en el estado de Baja California, México.

Las únicas publicaciones previas disponibles sobre cifras de prevalencia en el estado fueron realizadas por Núñez-Ochoa (2003), quien reportó una seroprevalencia en el estado de Baja California de 70.2%; es importante señalar que en este estudio solo se analizaron 37 perros que asistieron a clínicas veterinarias con o sin signos compatibles a la enfermedad y no se especifica el municipio de colección de muestras. Estos resultados no pueden equipararse con los nuestros, ya que involucró una pequeña cantidad de animales. Además, Haro-Álvarez et al. (2007) reportaron una prevalencia de 21.6% en Mexicali; una posible explicación a esta diferencia entre prevalencias (21.6% Vs. 6.3%) puede estar en que se presentó antes del brote de rickettsiosis en Mexicali (2009) donde se presentaron varios descensos en humanos; los propietarios de las mascotas y la Secretaria de Salud mostraron más sensibilidad sobre la importancia de aplicar programas de medicina preventiva para el combate a las garrapatas en el municipio, por medio de programas para el control y erradicación del vector, tales como: la deschatarrización en las colonias con alto índice de prevalencia, así como fumigaciones a domicilios y mascotas. Además, el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias colaboró por medio de un programa universitario de rickettsiosis brindando pláticas informativas para educar a la población sobre estos temas.

Recientemente, Backus et al. (2022) realizaron un estudio en 4 localidades (San Diego, Imperial, Tijuana y Mexicali) durante un periodo de octubre 2021 a mayo 2022 donde se analizaron 63 animales en Mexicali y 78 de Tijuana; se obtuvo una seroprevalencia de *Ehrlichia spp.*, 49.2 y 39.7% respectivamente. Sin embargo, estos resultados no pueden ser comparados con los nuestros debido a que en el estudio anterior se analizaron únicamente perros que habían sido abandonados por los propietarios y estuvieron en condiciones de encierro.

La prevalencia global obtenida en nuestro estudio fue de 4.79% (262/5469), esta cifra es muy parecida a las reportadas en Arkansas (3.6%), Tennessee (2.8%), Texas (2.0%), Luisiana (1.5%), Nebraska (1.6%) y en la zona oeste de México (Colima, Jalisco y Nayarit, con 4.23%), quienes comparten humedad y temperaturas parecidas a Baja California, sobre todo en los meses de agosto y septiembre. La prevalencia de Mexicali fue de 6.3% (206/3269), la cual es parecida a la reportada al sur de Italia con 7.6%, mismas que comparten meses cálidos en junio, julio, agosto y septiembre, aunque, la temperatura máxima llega a 28-30°C en Italia, la cual es diferente a Mexicali que puede llegar a 42°C, pero el porcentaje de precipitación es mínimo (<7%). La prevalencia de Tijuana que fue de 2.5% es muy parecida a la reportada en Carolina del Norte, Virginia, Tennessee (2.8%) y Texas (2.0%) donde sus temperaturas llegan a 30-35°C y en Tijuana 26°C, aunque sus porcentajes de precipitación son diferentes en los meses cálidos (Tijuana, 0% y demás sitios entre 29-50% de precipitación).

Con relación a la prevalencia por municipios, los perros de Mexicali presentaron más probabilidad de estar afectados que los perros de Tijuana, una posible explicación de este comportamiento puede estar en las condiciones climáticas, ya que en Tijuana

durante el transcurso del año cuentan con una temperatura promedio que varía de 9°C a 30°C (Weather spark, 2023), mientras que en Mexicali, durante el año, la temperatura varía de 6°C a 42°C (Weather spark, 2023). Al parecer las condiciones climáticas de Mexicali son más propicias para que el vector *Rhipicephalus sanguineus* sea más activo, presentándose en los casos de Mexicali una mayor proporción de animales afectados por garrapatas (279/3269) comparado con Tijuana (11/2200).

Cabe mencionar que algunos autores mencionan que no hay estudios suficientes sobre la diapausa de las garrapatas (estado de inactividad por factores extremos como: climáticos, escases de alimento, etc.) de este género; encontrándose en general que la garrapata disminuye su desarrollo en climas por debajo de 14°C y por arriba de 35°C (Dantas-Torres, 2010; Gray et al., 2013). En el caso de Mexicali es posible que no aplique lo antes señalado porque los casos se presentan aún en estas temperaturas (observado en la figura 11, en septiembre donde la temperatura llega a 44°C). Por lo anterior, es necesario realizar estudios ecológicos que permitan redimensionar la historia natural de la enfermedad y el comportamiento de los vectores en estos climas extremos. Con relación al comportamiento general de casos positivos mensuales, los meses más calientes tanto para Mexicali (junio, julio y agosto) como para Tijuana (agosto, septiembre y octubre), es cuando se presenta una mayor incidencia de la enfermedad.

La presencia de garrapatas y cohabitación o contacto con otros perros son factores de riesgo significativos en animales con la enfermedad, ya que son más propensos a estar en contacto con otros perros con el vector o en lugares donde el vector pueda encontrarse de manera abundante (Huerto-Medina y Dámaso-Mata,

2015; Navarrete et al., 2018 y Yuasa et al., 2012). En nuestro análisis univariado observamos que este factor de riesgo es significativo, pero esta asociación no fue demostrada por el análisis multivariado, mismo que nos ayuda a determinar si hay asociación entre todas las variables, sin perder la interacción o efecto entre las mismas.

El sexo del animal y la edad no tuvieron significancia estadística, pudiendo infectarse indiscriminadamente tal como se ha reportado en otros estudios (Milanjeet et al., 2014 y Navarrete et al., 2018). Esto puede responder a lo dicho anteriormente con la presencia de garrapatas y contacto con otros perros, si esto se mantiene a cualquier edad y cualquier sexo, la enfermedad se encontrará presente.

Con relación a los análisis hematológicos nuestros resultados coinciden con lo reportado por varios autores. La trombocitopenia es uno de los hallazgos importantes en la EMC, siendo este un agente que puede generar destrucción inmunomediada de plaquetas, consumo por hemorragias y disminución en la producción (Lara et al., 2020). Una posible explicación a este comportamiento es que el agente infeccioso condiciona una actividad mielosupresora, vasculitis y destrucción inmunomediada (Martínez et al., 2015; Ybañez et al., 2016) en individuos afectados, como resultado se presenta una disminución de las líneas de producción en médula ósea: la línea eritrocítica y megacariocítica. Pocos estudios reportan que puede afectar la línea mielocítica, generando leucopenia, pero en nuestros resultados no se mostró este efecto en esa línea (Piratae et al., 2019; Ybañez et al., 2016; Asgarali et al., 2012; Lara et al., 2020).

La linfopenia puede ser en respuesta a corticosteroides endógenos por estrés y la neutrofilia también por estrés o por proceso inflamatorio crónico. Uno de los cambios interesantes que se observaron en los neutrófilos fueron cambios tóxicos reconociendo a neutrófilos con cuerpos de Döhle o basofilia focal, este hallazgo está relacionado con presencia de agentes infecciosos e inflamación crónica (Ochoa et al., 2007; Harvey J. W., 2011).

Es importante señalar que de la totalidad de casos positivos a *Ehrlichia spp.* el 59.92% (157/262) fueron identificados con mórula lo que indicaría que los pacientes estaban cursando con la enfermedad aguda. Nuestros resultados muestran que proporcionalmente hay más animales en fase aguda, lo que lo hace propenso a diseminar rápidamente la enfermedad a más vectores y animales en contacto con ellos. En relación con lo dicho por Mylonakis et al. (2003), su estudio fue realizado en perros con signos clínicos de enfermedad aguda y positivos a la enfermedad, ellos demostraron que al usar capa leucoplaquetaria en frotis sanguíneos hay un 66% (33/50) de sensibilidad de encontrar mórulas. Por lo cual, se demuestra que realizar una búsqueda de mórulas es de utilidad en casos de curso agudo y subclínico, ya que podríamos detectar a la enfermedad en las primeras 2 semanas de infección, en contraste con las pruebas de ELISA que requieren cierta cantidad de anticuerpos en sangre que se logran en promedio a los 24 días (Gaunt et al., 2010). Otra alternativa es el uso de PCR, el cual puede no estar disponible o el costo no tan accesible.

Debido a la evidencia de *Anaplasma* como coinfección en el 96% de los casos de Tijuana, es importante identificar las especies de garrapatas presentes en el municipio, ya que se ha visto que la coinfección de estas dos enfermedades puede resultar en animales con enfermedad grave (Piratae et al., 2019).

CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio donde se reporta la prevalencia de la enfermedad incluyendo un mayor número de perros y municipios.

La prevalencia global de *Ehrlichia spp.* en perros fue de 4.79% (262/5469).

La prevalencia en el municipio de Mexicali (6.3%) fue mayor que la de Tijuana (2.5%); donde los perros de Mexicali presentaron 2.57 veces más probabilidad de presentar la enfermedad que los de Tijuana.

El contacto con otros perros y la presencia de garrapatas fueron los factores de riesgo identificados como asociados a la presencia de la enfermedad ($p < 0.05$).

Las alteraciones hematológicas relacionadas a la infección con *Ehrlichia spp.*, son trombocitopenia, neutrofilia y linfopenia.

LITERATURA CITADA

- Alberto-Carlos, R. S., F. Santos-Carvalho, A. Arias-Wenceslau, N. R. Pereira-Almosny y G. Rego-Albuquerque. 2011. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in South of Bahia, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(3): 210-214.
- Alkishe, A., M. E. Cobos, A. T. Peterson, and A. M. Samy. 2020. Recognizing sources of uncertainty in disease vector ecological niche models: an example with the tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Perspect. Ecol. Conserv.* 18(2):91-102.
- Almazán, C., V. H. González-Álvarez, I. G. F. de Mera, A. Cabezas-Cruz, R. Rodríguez-Martínez, and J. de la Fuente. 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(2):276-283.
- Angelou, A., Gelasakis, A. I., Verde, N., Pantchev, N., Schaper, R., Chandrashekar, R., and Papadopoulos, E. 2019. Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. *Parasites & vectors.* 12: 1-11.
- Ansari-Mood, M., J. Khoshnegah, M. Mohri, and S. M. Rajaei. 2015. Seroprevalence and risk factors of *Ehrlichia canis* infection among companion dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009–2010. *J Arthropod Borne Dis.* 9(2):184-194.

- Asgarali, Z., I. Pargass, J. Adam, A. Mutani, and C. Ezeokoli. 2012. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(4):207-211.
- Backus, L., J. Foley, C. Chung, S. Virata, O. E. Zazueta y A. López-Pérez. 2022. Tick-borne pathogens detected in sheltered dogs during and epidemic or Rocky Mountain spotted fever, a One Health challenge. *JAVMA.* 261(3):375-383.
- Barrantes-González, A. V., A. E. Jiménez-Rocha., J. J. Romero-Zuñiga, and G. Dolz. 2016. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(6):1245-1251.
- Bélanger, M., H L. Sorenson, M. K. France, M. V. Bowie, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, and A. R. Alleman. 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 40(9):3506-3508.
- Bhadesiya, C. M., and D. V. Modi. 2015. Correlation of epidemiology of *Rhipicephalus sanguineus* and canine ehrlichiosis in nine different localities of middle Gujarat. *Int. Agric. Sc. and Vet. Med.* 3(1):2320-3730.
- Beall, M. J., A. R. Alleman, E. B. Breitschwerdt, L. A Cohn, C. G. Couto, M. W. Dryden, L. C. Guptill, C. Lazbik, S. A. Kania, P. Lathan, S. E. Little, A. Roy, K. A. Sayler, B. A. Stillman, E. G. Welles, W. Wofson, and M. J. Yabsley. 2012. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasites and Vectors.* 5(1):1-11.

- Bouza-Mora, L., G. Dolz, A. Solórzano-Morales, J. J. Romero-Zuñiga, L. Salazar-Sánchez, M. B. Labruna, and D. M. Aguiar. 2017. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.* 8(1):36-40.
- Cabezas-Cruz, A., E. Allain, A. S. Ahmad, M. A. Saeed, I. Rashid, K. Ashraf, L. Yousfi, W. Shehzad, L. Indjein, M. Rodríguez-Valle, A. Estrada-Peña, D. Obregón, A. Jabbar, and S. Moutailler. 2019. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (sl). *Parasites and Vectors.* 12(1):1-13.
- Carrade D., J. Foley, M. Sullivan, C. W. Foley, and J. E. Sykes. 2011. Spatial distribution of seroprevalence for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* in dogs in Washington, Oregon, and California. *Vet. Clin. Pathol.* 40(3):293-302.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites and Vectors.* 3(1):1-11.
- Debnath, M., G. B. Prasad, and P. S. Bisen. 2010. Introduction to Molecular Diagnostics. In: *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. 1th ed. Springer, Dordrecht. p. 1-10.
- Ebani, V. V. 2019. Serological survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from central Italy: An update (2013–2017). *Pathogens.* 8(1):1-7.

- Eiras, D. F., M. V. Craviotto, D. Vezzani, O. Eyal, and G. Baneth. 2013. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36(2):169-173.
- Escribano, D., H. Cihan, S. Martínez-Subiela, P. Levent, M. Kocaturk, N. Aytug, J. J. Cerón, A. Tvarijonaviciute, and Z. Yilmaz. 2017. Changes in serum proteins in dogs with *Ehrlichia canis* infection. *Microb. Pathog.* 113:34-39.
- Fonseca, J. P., F. R. P. Bruhn, M. J. M. Ribeiro, C. Hirsch, C. M. B. M. Rocha, E. Guedes, and A. M. Guimarães. 2017. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. *Cienc. Anim. Bras.*18:1-6.
- Gaunt, S. D., M. J. Beall, B. A. Stillman, L. Lorentzen, P. P. V. P. Diniz, R. Chandrashekar, and E. B. Breitschwerdt. 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites and Vectors.* 3(1):1-10.
- Gray, J., F. Dantas-Torres, A. Estrada-Peña y M. Levin. 2013. Systematics and ecology of the brown tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 4:171-180
- Gutiérrez, C. N., and L. Perez-Yabarra. 2016. Ehrlichiosis canina. *Saber.* 28(4):641-665.
- Haro-Álvarez P., G. López-Valencia, L. Tinoco-Gracia, T. Rentería-Evangelista, and G. Medina-Basulto. 2007. Seroprevalence and traceback of animals suspected of carrying *Ehrlichia canis*, in dogs attended in veterinary clinics in Mexicali, Baja California, México. *J. Anim. Vet. Adv.* 6(7):850-854.

- Harrus, S., and T. Waner. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*. 187(3):292-296.
- Harrus, S., T. Waner, and M. Neer. 2012. *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. C. E. Greene. 4th ed. WB Saunders\Elsevier Science. St Louis, Mo. p.227-238.
- Harvey, J. W. 2011. *Veterinary Hematology-E-Book: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. 1th ed. Elsevier Health Sciences. St Louis Missouri. p. 49-121.
- Haryanto, A., and I. Tjahajati. 2020. Molecular characterization and blood hematology profile of dogs infected by *Ehrlichia canis* in Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 21(7):3242-3248.
- Jurkovic D., A. Beck, D. Huber, Z. Mihaljevic, A. Poljinghorne, F. Martinkovic, D. Lukacevic, M. Pilat, R. Brezak, S. Bosnic, and R. Beck. 2019. Seroprevalence of vector-borne pathogens in dogs from Croatia. *Arthropods and Medical Entomology*. 118:347-352.
- Kaewmongkol, G., N. Lukkana, S. Yangtara, S. Kaewmongkol, N. Thengchaisri, T. Sirinarumitr, J. Sathaporn, and S. G. Fenwick. 2017. Association of *Ehrlichia canis*, Hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. *Vet. Microbiol*. 201:195-200.
- Kaur, N., H. Singh, P. Sharma, N. K. Singh, N. Kashyap, and N. K. Singh. 2020. Development and application of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs. *Acta Trop*. 212:1-8.

- Koivunen, M. E., and Krogsrud. 2006. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Lab. Med.* 37(8):490-497.
- Kottadamane, M. R., P. S. Dhaliwal, L. D. Singla, B. K. Bansal, and S. K. Uppal. 2017. Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. *Vet. World.* 10(2):255-262.
- Lara, B., A. Conan, M. A. Thrall, J. K. Ketzis, G. C. Branford, and S. Rajeev. 2020. Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. *Pathogens.* 9(6):1-9.
- Lee, S., H. Lee, J-W. Park, S-S. Yoon, H-J. Seo, J. Noh, M-S. Yoo, K-H. Kim, Y. Park, Y. S. Cho y B. J. So. 2020. Prevalence of antibodies against *Anaplasma spp.*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Babesia gibsoni*, and *Ehrlichia spp.* In dogs in the Republic of Korea. *Ticks Tick Borne Dis.* 11(4): 1-6.
- Manyarara, R., U. Tubbesing, M. Soni, and B. H. Noden. 2015. Serodetection of *Ehrlichia canis* amongst dogs in central Namibia. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 86(1):1-3.
- Martínez, A., Arraga-Alvarado, C. M., Triana-Alonso, F. J., Ruiz, C., y Gutiérrez, G. 2015. A serological and molecular survey of *Ehrlichia canis* in dogs from a community in Aragua state, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 26(4): 648-656.
- Melo, A. L., T. F. Martins, M. C. Horta, Moraes-Filho, J., Pacheco, R. C., Labruna, M. B., and Aguiar, D. M. 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia spp.*

- and *Rickettsia spp.* in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2(4): 213-218.
- Merino-Charrez, O., V. Badillo-Moreno, J. Loredó-Ostí, H. Barrios-García y V. Carvajal-de-la-Fuente. 2021. Detección molecular de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* y alteraciones hematológicas de perros infectados. *Abanico vet.* 2:0-16.
- Milanjeet, H. S., N. K. Singh, N. D. Singh, C. Singh, and S. S. Rath. 2014. Molecular prevalence and risk factors for the occurrence of canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Med.* 59(3):129-136.
- Mittal, M., K. Kundu, S. Chakravarti, J. K. Mohapatra, K. Nehra, V. K. Sinha, B. S. Sanjeet, C. P. Churamani, and A. Kumar. 2017. Canine Monocytic Ehrlichiosis among working dogs of organised kennels in India: A comprehensive analyses of clinico-pathology, serological and molecular epidemiological approach. *Prev. Vet. Med.* 147:26-33.
- Movilla, R., C. García, S. Siebert, and X. Roura. 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma spp.*, *Borrelia burgdorferi (sensu lato)*, *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in México. *Parasites and Vectors.* 9(1):1-12.
- Mylonakis, M. E., A. F. Koutinas, C. Billinis, L. S. Leontides, V. Kontos, O. Papadopoulos, T. Rallis y A. Fytianou. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet. Microbiol.* 91: 197-204

- Navarrete, M. G., M. D. Cordeiro, C. B. Silva, C. L. Massard, E. R. López, J. C. A. Rodriguez, C. C. D. U. Ribeiro, O. F. Rodriguez y A. H. Fonseca. 2018. Serological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* and associated risk factors in dogs domiciled in western Cuba. *Vet. Parasitol. Reg. Stud.*14: 170-175.
- Núñez-Ochoa, L. 2003. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. *AMMVEPE.*14(3):83-85.
- Núñez, O. L., J. Bouda. 2007. Anexo valores de referencia. En: *Patología Clínica Veterinaria*. 2da edición. UNAM-FMVZ. p. 332.
- Ojeda-Chi, M. M., R. I. Rodriguez-Vivas, M. D. Esteve-Gasent, A. A. P. de León, J. J. Modarelli, and S. L. Villegas-Perez. 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 67:1-6.
- Pantchev N., M. Schnyder, M.G. Vrhovec, R. Schaper, and I. Tsachev. 2015. Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Bulgaria. *Parasitol. Res.* 114(1):S117-S130.
- Paulino, P. G., M. S. Pires, C. B. da Silva, M. Peckle, R. L. da Costa, G. V. Vitari, A. R. Vilela, A. P. Martinez, C. L. Massard, and H. A. Santos. 2018. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 159:135-142.

- Parashar, R., V. Sudan, A. K. Jaiswal, A. Srivastava, and D. Shanker. 2016. Evaluation of clinical, biochemical and haematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Parasit. Dis.* 40(4):1351-1354.
- Pesapane, R., J. Foley, R. Thomas, and L. R. Castro. 2019. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from northern Colombia. *Vet. Microbiol.* 233:184-189.
- Piantedosi, D., B. Neola, N. D'Alessio, F. Di Prisco, M. Santoro, L. Pacifico, G. Sgroi, L. Auletta, J. Buch, R. Chandrashekar, E. B. Breitschwerdt, and V. Veneziano. 2017. Seroprevalence and risk factors associated with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *D. immitis* in hunting dogs from southern Italy. *Parasitol. Res.* 116(10):2651-2660.
- Pinter, A., M. C. Horta, R. C. Pacheco, J. Moraes-Filho, and M. B. Labruna. 2008. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cad. Saude Publica.* 24: 247-252.
- Piratae, S., P. Senawong, P. Chalermchat, W. Harnarsa, and B. Sae-Chue. 2019. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin, Thailand. *Vet. World.* 12(1):131-134.
- Rodríguez-Alarcón, C. A., D. M. Beristain-Ruiz, A. Olivares-Muñoz, A. Quezada-Casasola, F. Pérez-Casio, J. A. Álvarez-Martínez, J. Tapia-Alanís, J. J. Lira-Amaya, R. Rivera-Barreno, O. S. Cera-Hurtado, J. A. Ibanovichi-Camarillo, L.

- Soon-Gómez, J. R. Adame-Gallegos, and J. V. Figueroa-Millán. 2020. Demonstrating the presence of *Ehrlichia canis* DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. *Parasites and Vectors*.13(1):1-7.
- Rodríguez-Vivas, R. I., M. E. Bolio-González, and M. M. Ojeda-Chi. 2015. Diagnóstico de la ehrlichiosis monocítica canina: una revisión actualizada. *Ciencia y Agricultura*. 12(1):83-96.
- Rodríguez-Vivas, R. I., R. E. F. Albornoz, and G. M. E. Bolio. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol*. 127(1):75-79.
- Sainz, Á., X. Roura, G. Miró, A. Estrada-Peña, B. Kohn, S. Harrus, and L. Solano-Gallego. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and Vectors*. 8(1):1-20.
- Salinas-Meléndez, J. A., M. A. Cantú-Martínez, A. Wong-González, J. J. Hernández-Escareño, R. Avalos-Ramírez, J. J. Zárate-Ramos, and V. M. Riojas-Valdés. 2015. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs from Monterrey, México. *Afr. J. Microbiol. Res*. 9(35):1974-1977.
- Selim, A., A. Abdelhady y J. Alahadeb. 2020. Prevalence and first molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Egyptian dogs. *Pak Vet J*. 41(1):117-121.
- Sosa-Gutiérrez, C. G., Quintero M. T. Martínez, S. M. Gaxiola-Camacho, S. Cota-Guajardo, M. D. Esteve-Gassent, and M. G. Gordillo-Pérez. 2013. Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic ehrlichiosis in dogs infested with ticks from Sinaloa, México. *J. Vet. Med*. 2013:1-3

- Springer, A., V. M. Montenegro, S. Schicht, N. Pantchev, and C. Strube. 2018. Seroprevalence and current infections of canine vector-borne diseases in Nicaragua. *Parasites and Vectors*. 11(1): 1-9.
- Stockham, S. L., and M. A. Scott. 2013. Morphologic Features of Erythrocytes: Clinical Significance and Pathogenesis. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Stockham, S. L., and M. A. Scott. 2th ed. John Wiley and Sons. State Avenue, Ames, Iowa. p. 228-250.
- Suksawat J., C. H. Barbara and B. B. Edward. 2000. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in Sick Dogs from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.* 14:50-55.
- Tanikawa, A., M. B. Labruna, A. Costa, D. M. Aguiar, S. V. Justiniano, R. S. Mendes, A. L. T. Melo, C. J. Alves y S. S. Azevedo. 2013. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid región of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factos. *Res. Vet. Sci.* 94(3): 474-477.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz-Romero, M. T. Quintero-Martínez, T. B. Rentería-Evangelista, Y. González-Medina, A. Barreras-Serrano, S. Hori-Oshima, and J. Vinasco. 2009. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the México-USA border. *Vet. Rec.* 164:59-61
- Thrall, M. A., G. Weiser, R. W. Allison, and T. W. Campbell. 2012. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2th ed. John Wiley & Sons. West Indies. p. 3-19.

- Vieira, R. F. D., T. S. W. J. Vieira, D. A. G. Nascimento, T. F. Martins, F. S. Krawczak, M. B. Labruna, R. Chandrashekar, M. Marcondes, A. W. Biondo and O. Vidotto. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses, and humans: Zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 55(5):335-340.
- Villaescusa, A., M. A. Tesouro, M. García-Sancho, T. Ayllón, F. Rodríguez-Franco, and A. Sainz. 2012. Evaluation of lymphocyte populations in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* with and without clinical signs. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(5-6):279-282.
- Villaescusa, A., M. A. Tesouro, M. García-Sancho, T. Ayllón, F. Rodríguez-Franco, and A. Sainz. 2012. Evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in family-owned dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35(4):391-396.
- Villeneuve, A., J. Goring, L. Marcotte, and S. Overvelde. 2011. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* among dogs in Canada. *Can. Vet. J.* 52(5):527-530.
- Weather spark. 2021-2022. Climate and Average Weather Year Round in different cities. Blog. Disponible en: <https://weatherspark.com/y/2211/Average-Weather-in-Mexicali-Mexico-Year-Round> Fecha de acceso 16 de mayo 2023.
- Ybañez, A. P., R. H. D. Ybañez, R. R. Villavelez, H. P. F. Malingin, D. N. M. Barrameda, S. V. Naquila, and S. M. B. Olimpos. 2016. Retrospective analyses of dogs found

serologically positive for *Ehrlichia canis* in Cebu, Philippines from 2003 to 2014. Vet. World. 9(1):43-47.

Yuasa, Y., T-H. Hsu, C-C. Chou, C-C. Huang, W-C. Huang y C-C. Chang. 2012. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species, and *Dirofilaria immitis* in dogs. CIMID. 35(6): 599-606.

ANEXO 1. Cuestionario de pacientes

Nombre o identificación	
Fecha y hora de obtención de muestra	
Expediente	
Especie, raza, edad y sexo	
Ayuno	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
Historia, anamnesis y hallazgos relevantes en el examen físico general	
Presencia de garrapatas	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
Cohabitación con otros animales	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
Acceso a la calle	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
Seguimiento de otros estudios	

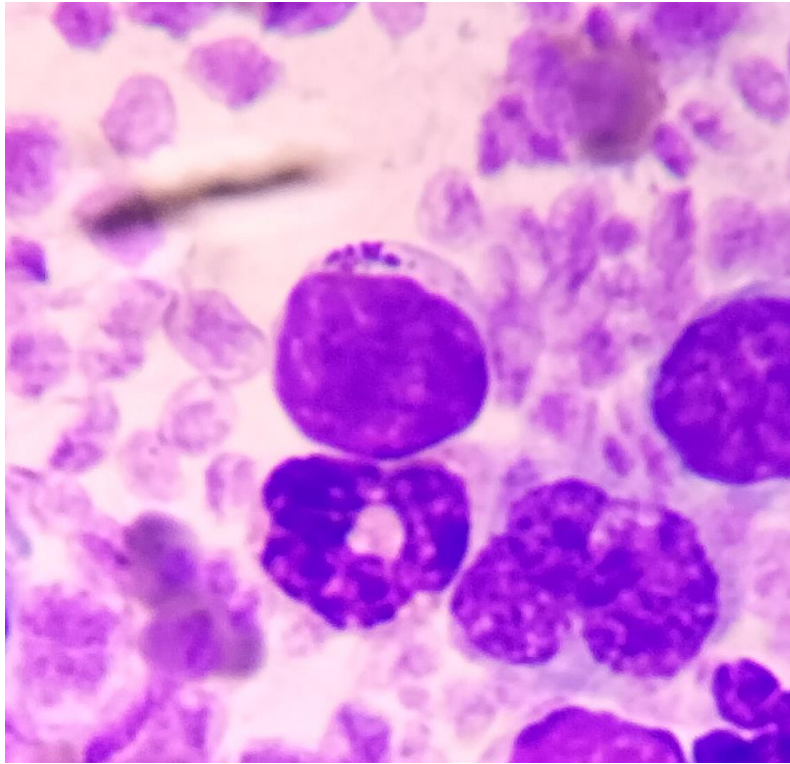


Figura 12. Presencia de mórula en linfocito de *Ehrlichia spp.* en una capa leucoplaquetaria (Fotografiado en 1000x).