

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Biología



**Detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en perros de
Ciudad San Cristóbal, Guatemala, que han presentado
infestación de garrapatas en el último año según el archivo de
Clínica Veterinaria Ixchel**

Trabajo de investigación presentado
por Jennifer Alejandrina Carbonell Ellgutter
para optar al grado de Licenciado en Biología

Guatemala

2006

**Detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en perros de
Ciudad San Cristóbal, Guatemala, que han presentado
infestación de garrapatas en el último año según el archivo de
Clínica Veterinaria Ixchel**

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Biología

**Detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en perros de
Ciudad San Cristóbal, Guatemala, que han presentado
infestación de garrapatas en el último año según el archivo de
Clínica Veterinaria Ixchel**

Trabajo de investigación presentado
por Jennifer Alejandrina Carbonell Ellgutter
para optar al grado de Licenciado en Biología

Guatemala

2006

Vo.Bo.:

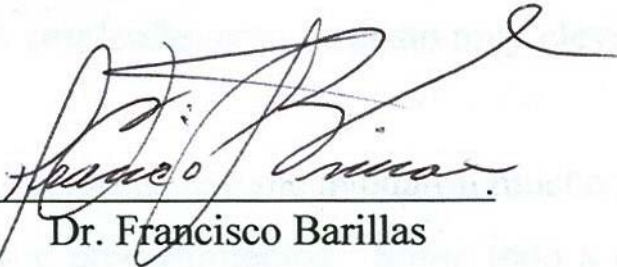


Dr. Danilo Álvarez

Terna:



Lcda. Margarita Palmieri



Dr. Francisco Barillas



Dr. Danilo Álvarez

PREFACIO

Este trabajo surge de mi interés hacia los mamíferos, así como a las enfermedades animales. Debido a que siempre he estado atraída hacia la epidemiología animal. Esta investigación es de gran importancia debido a que muchos mamíferos alrededor del mundo se están viendo afectados por enfermedades transmitidas por garrapatas, como la Ehrlichiosis. Y como en Guatemala no se han realizado estudios sobre esta enfermedad, es básico el comenzar con estudios preliminares.

Se tuvieron varias limitaciones en el trabajo debido a la falta de recursos monetarios, por lo que no se pudo realizar un estudio mucho más complejo ya que el precio de las pruebas de ELISA empleadas eran de costo muy elevado.

Agradezco mucho a mis asesores que me ayudaron mucho con la información, así como con las distintas técnicas y procedimientos. Sobre todo a mi mamá por haberme apoyado en todo el proceso y haberme proporcionado los fondos para poder llevarla a cabo.

ÍNDICE

Contenido	Páginas
PREFACIO	vi
ÍNDICE	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
A. ANTECEDENTES	1
1. Características generales de ehrlichiosis	1
2. Historia e importancia de <i>Ehrlichia</i> en medicina veterinaria	2
3. Etiología de la ehrlichiosis canina	4
a. Taxonomía	5
b. Transmisión	7
c. Patogenia	8
d. Signos clínicos y anormalidades de laboratorio	10
e. Analítica sanguínea y de orina	12
f. Diagnóstico	12
g. Aspectos inmunológicos	14
h. Tratamiento	14
i. Profilaxis	16

4. Epidemiología	16
a. Reservorios y vectores	16
1) Biología del vector	17
2) Ciclo biológico del vector	18
3) Distribución del vector en Guatemala	19
4) Identificación del vector	19
b. Distribución geográfica e incidencia	20
B. JUSTIFICACIÓN	21
C. OBJETIVOS	22
1. General	22
2. Específico	22
D. HIPÓTESIS	22
II. METODOS	23
A. Área de estudio	23
B. Selección de muestra	24
C. Extracción e identificación de las garrapatas	25
D. Obtención de muestras de sangre	25
E. Separación y extracción de suero	27
F. Almacenamiento	27
G. Realización de la prueba de diagnóstico	27
1. Principio de la prueba	27
2. Procedimiento	28
H. Análisis de resultados	30
III. RESULTADOS	31
A. Identificación de garrapatas	31
B. Prueba de diagnóstico ELISA para <i>E. canis</i>	31

IV. DISCUSIÓN	35
A. Identificación de garrapatas	35
B. Prueba de diagnóstico ELISA para <i>E. canis</i>	35
V. CONCLUSIONES	39
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. LITERATURA CITADA	43
VIII. ANEXOS	47
Anexo 1. Partes de una garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	48
Anexo 2. Glosario.....	49
Anexo 3. Hoja de registro de los perros muestreados.....	52

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Diferenciación de las especies del género	6
2. Distribución por sexo de los individuos muestreados para la determinación de la presencia de anticuerpos contra <i>E. canis</i>	31
3. Distribución por raza de los individuos muestreados para la determinación de la presencia de anticuerpos contra <i>E. canis</i>	32
4. Distribución por edad de los individuos muestreados para la determinación de la presencia de anticuerpos contra <i>E. canis</i>	32
5. Distribución por procedencia de los individuos muestreados para la determinación de la presencia de anticuerpos contra <i>E. canis</i>	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Mórula de <i>Ehrlichia canis</i>	13
2. Garrapata café del perro, <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	17
3. Identificación de <i>R. sanguineus</i>	20
4. Mapa de Ciudad San Cristóbal	23
5. Obtención de muestras de sangre	26
6. Prueba Snap 3Dx	30
7. Mapa de áreas con seropositividad en Ciudad San Cristóbal	33

RESUMEN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad causada por *Ehrlichia canis*, bacterias gram negativo que son parásitos intracelulares obligatorios. Es transmitida por la garrapata café del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, y puede ser transmitida a humanos. La importancia de realizar un estudio en Guatemala sobre la ehrlichiosis canina básicamente es debido a que no hay estudios previos sobre esta enfermedad. Y más que todo por la gran importancia que han adquirido las enfermedades transmitidas por garrapatas en estos tiempos debido a la amenaza hacia muchas especies de mamíferos.

Para realizar un estudio preliminar sobre la situación de la *E. canis* se desarrolló la prueba de ELISA a 86 sueros extraídos de perros que tuvieron problema de garrapatas. Con esto se obtuvo la prevalencia de la enfermedad (8.14%), que aunque fue poco significativa, comprobó que en Ciudad San Cristóbal, departamento de Guatemala, hay perros que poseen anticuerpos circulantes contra *E. canis*, debido al contacto con el vector de esta enfermedad (*R. sanguineus*). Aunque, existen varios factores que pueden incidir en la presentación de anticuerpos, como lo son la edad, el sexo, la raza y la procedencia del perro, en este estudio no se pudo determinar de manera concluyente si estuvieron estos factores asociados a la positividad de la muestra, probablemente en un estudio con mayor cantidad de muestras o en un área en la que el vector se encuentre más fuertemente distribuido los resultados si se vean influidos por alguno de los factores.

La prueba empleada solamente mostró la presencia de anticuerpos de *E. canis* y no si el perro tenía la enfermedad, debido a esto no se pudo hacer conclusiones más concisas sobre los síntomas observados en algunos de los perros positivos. Por lo tanto en un estudio posterior deben emplearse varias técnicas que complementen los datos

obtenidos por cada una de estas, por ejemplo: frote de mórula, prueba de inmunofluorescencia de anticuerpos, ELISA, aislamiento del organismo, PCR, Western-blot, etc.

ABSTRACT

Canine Ehrlichiosis is a disease caused by *Ehrlichia canis*, gram negative bacteria which is a obligatory intracellular parasite. It is transmitted by the brown tick of dogs, *Rhipicephalus sanguineus*, and it can be transmitted to humans too. The importance of conducting this research on the canine ehrlichiosis is because there are no previous studies on this disease in Guatemala, and more than anything by the great importance that the diseases transmitted by ticks have acquired due to the threat they pose to many mammal species.

In order to make a preliminary study on the situation of *E. canis*, 86 serums extracted from dogs that had tick problems were run through the ELISA test. With the results of the tests the prevalence of the disease was obtained (8.14 %), although it wasn't very significative, it proved that there are dogs with circulating antibodies against *E. canis*, due to contact with the vector of this disease (*R. sanguineus*) in City San Cristóbal, department of Guatemala. Although there are several factors that can cause the presence of antibodies: age, sex, race and origin of the dog; in this study it wasn't possible to determine in a conclusive way if these factors were associated with the presence of the antibodies in the sample studied. To be able to appreciate if these factors affect the results a thorough study should be conducted using a greater amount of samples or in an area where the vector is highly distributed.

With the test used it was only possible to observe the presence of antibodies, not if the dog had the disease, because of this it wasn't possible to make more concise conclusions on the symptoms observed in some of the dogs that tested positive to the presence of antibodies. Because of this, it is recommended that in later studies, several techniques such as: visualization of morula within monocytes on cytology,

immunofluorescence of antibodies, ELISA, PCR, Western-blot, to isolate the microorganism, etc. should be applied to compliment the data obtained by the tests ran in this study.

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las enfermedades transmitidas por garrapatas causadas por bacterias intracelulares han incrementado su importancia debido a la amenaza a mamíferos en el mundo entero. Debido a esto se realizó el presente trabajo con el objetivo principal de conocer si la enfermedad Ehrlichiosis canina (transmitida por garrapatas), producida por *Ehrlichia canis*, se encuentra presente en Ciudad San Cristóbal, Guatemala.

A. Antecedentes

1. **Características generales de Ehrlichiosis.** Los microorganismos de la tribu *Ehrlichieae* son Rickettsias, pertenecientes a la familia *Rickettsiaceae*, que parasitan a los leucocitos (Biberstein y Zee 1994). Las enfermedades por rickettsias son muy comunes en perros y hay mayor prevalencia durante la temporada de calor, o después de la misma (Birchard y Sherding 1996). Se multiplican en el interior de vesículas intracitoplasmáticas recubiertas por la membrana. En frotis de sangre, se pueden descubrir sus colonias (mórulas), con un diámetro $\leq 4 \mu\text{m}$, formadas por los <<cuerpos elementales>>, cuyo diámetro es $\leq 1 \mu\text{m}$. Poseen pared celular (Biberstein y Zee 1994).

Existen varias especies de esta tribu, entre éstas se encuentran: *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi*, *E. platys*, *E. ewingii*, *E. chafeensis*, *E. boris*, *E. ovis*, *E. canis*, *E. sennetsu* y *E. risticii*. No hay mucha información acerca de sus actividades metabólicas y solamente las tres últimas se han conseguido multiplicar en cultivos celulares. Aquellas especies cuyo vector se sabe son garrapatas (*E. canis* y *E. phagocytophila*) se transmiten de un estadio a otro, pero no por vía transovárica (Biberstein y Zee 1994).

El curso clínico de las enfermedades por rickettsias puede ser agudo (p. ej., fiebre manchada de las Montañas Rocosas, hemobartonelosis, ehrlichiosis) o subagudo a crónico (p. ej., ehrlichiosis, intoxicación por salmón). La mayor parte de las

enfermedades por rickettsias responden a tratamiento con tetraciclina, doxiciclina o cloramfenicol (Birchard y Sherding 1996).

Las ehrlichiosis transmitidas por garrapatas se pasan de un animal a otro, al ser infestados por garrapatas que han estado en contacto con sangre infectada con estas rickettsias. La sangre al ser conservada a temperatura ambiente, puede seguir siendo infecciosa durante 10 días, durante 14 días a temperatura de nevera (alrededor de 0°C), y durante 1½ años a -80°C (Biberstein y Zee 1994).

La distribución geográfica actual de la ehrlichiosis es especialmente en las latitudes tropicales y subtropicales. Se ha reportado en todos los continentes menos en Australia (Biberstein y Zee 1994).

2. Historia e importancia de *Ehrlichia* en medicina veterinaria. La primera *Ehrlichia* que se descubrió fue *Ehrlichia canis* en un perro Pastor Alemán en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935 (Gobierno Vasco 1997). En 1963 se describieron unas inclusiones en los leucocitos de los perros infectados por *Babesia canis*. Al año siguiente se identificaron las mismas con un estado morular de *Ehrlichia*, probablemente *E. canis*. En 1965, se describieron en el perro las infecciones de babesiosis, ehrlichiosis y mixtas (Coles 1968). Hasta finales de los años 60, la erlichiosis canina se consideraba como un proceso relativamente benigno. Fue la epizootía que se desencadenó en los perros de la armada americana en Vietnam, la que hizo cambiar la consideración que hasta el momento se tenía sobre la enfermedad, ya que alrededor de 300 perros desarrollaron una enfermedad hemorrágica fatal, llamada pancitopenia tropical canina, caracterizada por debilidad, epistaxis, anemia y leucopenia. Tras la observación de inclusiones basófilas en monocitos, se consideró como una forma grave de erlichiosis canina. Posteriormente estudios experimentales de la enfermedad han descrito tres fases clínicas. Una fase aguda, con hipertermia, anorexia, pérdida de peso, conjuntivitis, edemas y vómitos, con pancitopenia transitoria; una fase subclínica, que dura varias semanas, y durante la cual los animales permanecen infectados pero asintomáticos, con trombocitopenia moderada, hiperglobulinemia, e incremento del título

de anticuerpos. La tercera fase, o terminal, depende de la mayor o menor susceptibilidad de la raza de perro. Estudios realizados en los años 70 demostraron que el vector era *Rhipicephalus sanguineus* y que tanto las larvas como las ninfas eran capaces de adquirir la infección y la transmitían una vez alcanzado el estado adulto (Gobierno Vasco 1997).

En 1971 se describió una ehrlichia granulocítica en perros que años más tarde se denominó *Ehrlichia ewingii*. Su presencia se asocia a los síntomas de hipertermia, trombocitopenia y poliartritis, y, de momento está únicamente descrita en Estados Unidos. En Europa también existen referencias de ehrlichias granulocíticas en perros, pero estudios genéticos indican que se tratan de especies diferentes (Gobierno Vasco 1997).

Pocos años después del hallazgo de *E. ewingii* se describió una erlichia morfológicamente similar a *E. canis*, que parasitaba plaquetas de perros, dando lugar a síntomas de fiebre, depresión, anorexia, trombocitopenia y se denominó *Ehrlichia platys*. Genéticamente, esta especie posee una alta similitud con la erlichia granulocítica humana, *E. equi* y *E. phagocytophila*, englobándose en el mismo grupo (Gobierno Vasco 1997).

La ehrlichiosis canina tomó mayor importancia entre los veterinarios debido a la necesidad de diferenciarla del moquillo canino (enfermedad muy común en el perro y de alta mortalidad) (Runnells *et al.* 1982). Posteriormente se le prestó atención en 1987 cuando *E. chaffeensis*, un organismo muy emparentado, fue identificado como la causa de la ehrlichiosis monocítica humana. Subsecuentemente, en 1996, se demostró que *E. chaffeensis* causa signos de enfermedad en los perros indistinguible de la infección provocada por *E. canis* (Simón 2005).

Ehrlichia equi fue hallado en 1979 (enfermedad en caballos) y años después apareció una nueva enfermedad en caballos y ponis en las inmediaciones del río Potomac en el estado de Maryland (EEUU), que se caracterizaba por fiebre, anorexia, leucopenia, edemas, diarrea acuosa y deshidratación. La enfermedad parecía corresponder a una nueva entidad clínica de causa desconocida, y se llamó Fiebre de Potomac,

diagnosticándose en los cinco años siguientes varios cientos de casos en diferentes estados americanos. En 1984 se identificó finalmente como *Ehrlichia risticii*, aislándose en cultivos celulares a partir de la sangre de caballos sospechosos, y a consecuencia de ello se pudo poner a punto técnicas específicas de diagnóstico serológico. Estudios recientes muestran que *E. risticii* puede transmitirse transplacentariamente al feto si las madres se infectan durante la gestación, y en los últimos años se han citado numerosos casos de abortos a término (Gobierno Vasco 1997).

Se han presentado casos de ehrlichiosis en bovinos (*E. boris* y *E. phagocytophila*), ovinos (*E. ovina* y *E. phagocytophila*), roedores (*E. muris*), porcinos (*E. boris*) (Carter y Chengappa 1994).

3. Etiología de la ehrlichiosis canina. La ehrlichiosis canina es una enfermedad causada por rickettsias, relativamente comunes en perros, la cual recientemente ha sido confirmada como zoonosis (Birchard y Sherding 1996). Esta rickettsia llamada *Ehrlichia canis*, es un microorganismo pleomórfico, cocoide gram negativo, aeróbico que no crece en medios bacteriológicos estándar. Se caracteriza por la sobrevivencia intracelular obligada tanto en el huésped vertebrado como en el vector invertebrado (López *et al.* 1999).

Los sinónimos utilizados en la literatura para este trastorno incluyen enfermedad de los perros rastreadores, pancitopenia canina tropical, fiebre hemorrágica canina, tífus canino y ehrlichiosis monocítica canina (Simón 2005).

El germen se presenta como masas esféricas en el interior de los monocitos del perro, en el que produce una enfermedad aguda mortal (Merchant y Packer 1980). *E. canis* se multiplica en células mononucleares circulantes, las células infectadas son transportadas vía sanguínea a otros órganos, especialmente pulmones, riñones y meninges. Las células infectadas se adhieren al endotelio vascular, produciendo vasculitis y una infección en el tejido subendotelial (López *et al.* 1999).

Dentro del ciclo biológico de *E. canis*, se pueden distinguir diferentes formas: cuerpos elementales, que tiene un diámetro de 0.5-0.9 μ m. Estos se dividen por fisión binaria para dar lugar a los cuerpos iniciales, de 1.5-2.5 μ m, que a su vez se dividen produciéndose las típicas mórulas. Las mórulas pueden estar formadas incluso por más de 40 cuerpos elementales) que pueden llegar a tener un tamaño de 4-5 μ m (Sainz *et al.* 2000).

a. Taxonomía. La bacteria pertenece a:

Reino Procariota

Orden Rickettsiales

Familia Rickettsiaceae

Tribu Ehrlichieae

Género *Ehrlichia*

Especie *Ehrlichia canis* (Todar 2005)(CDC 2000).

Las *Ehrlichia* son bacterias relacionadas a Rickettsia y son parásitos intracelulares obligatorios, lo que significa que no pueden sobrevivir fuera de las células (Rey 2002). Existen otras especies de *Ehrlichia* que pueden infectar a los perros como, *E. platys*, *E. equi*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*. La infección por los agentes anteriormente nombrados, producirían manifestaciones clínicas más benignas en comparación a las que produce *E. canis* (López *et al.* 1999). Las especies de *Ehrlichia* muchas veces se pueden identificar basándose en el tipo de célula de mamíferos que infectan. Monocitos, granulocitos y neutrófilos son las células involucradas con más frecuencia y el nombre de la enfermedad resultante suele basarse en el tipo de célula (Ehrlichiosis monocítica o granulocítica). Así también pueden diferenciarse unas de otras debido al hospedero, al vector, a las células infectadas y por la enfermedad que producen (Cuadro 1). Más de una especie de *Ehrlichia* puede causar enfermedad en la mayoría de los hospederos vertebrados (Rey *et al.* 2002).

Cuadro 1. Diferenciación de especies del género, por medio de la identificación de los distintos huéspedes, vectores, enfermedades y células infectadas de las distintas especies.

Especie	Huésped	Células sanguíneas afectadas	Vector	Enfermedad
<i>E. canis</i>	Cánidos, humano	Monocitos/macrófagos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ehrlichiosis monocítica canina o Pancitopenia
<i>E. chaffeensis</i>	Humano, ciervo	Monocitos/macrófagos	<i>Amblyomma americanum</i>	Ehrlichiosis monocítica humana
<i>E. muris</i>	Roedores	Monocitos/macrófagos	Se desconoce	Ehrlichiosis en roedores
<i>E. ewingi</i>	Cánidos	Granulocitos	<i>A. americanum</i>	Ehrlichiosis granulocítica canina
<i>Cowdria ruminantium</i>	Rumiantes	Células endoteliales	<i>Amblyomma spp.</i>	Septicemia aguda
<i>E. equi</i>	Équidos	Granulocitos	<i>Ixodes pacificus</i>	Ehrlichiosis equina
<i>E. phagocytophila</i>	Bovinos, ovinos	Granulocitos	<i>I. ricinus</i>	Fiebre de los pastizales
<i>E. platys</i>	Cánidos	Plaquetas	Se desconoce	Trombocitopenia clínica infecciosa canina
<i>E. Boris</i>	Rumiantes y porcinos	Monocitos/macrófagos	<i>Hyalomma aegyptium</i> y <i>R. appendiculatus</i> , respectivamente	Ehrlichiosis bovina y Ehrlichiosis porcina, respectivamente
<i>E. ovina</i>	Ovinos	Monocitos/macrófagos	<i>R. bursa</i>	Ehrlichiosis ovina
<i>E. sennetsu</i>	Humano	Monocitos/macrófagos	Se desconoce	Fiebre de Sennetsu
<i>E. risticii</i>	Équidos	Monocitos/macrófagos	Se desconoce	Fiebre equina del Potomac o Ehrlichiosis monocítica equina
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Hombre		Endémica en ácaros de la madera, conejos y perro. En heces y todos los tejidos de ácaros	Fiebre moteada de las Montañas

			(<i>Dermacentor</i> , <i>Amblyoma</i> , <i>Rhipicephalus</i>)	
<i>Neorickettia</i> <i>helminthoeca</i>	Cánidos	Macrófagos	Trematodos	Envenenamiento por salmón

(Carter y Chengappa 1994)(Vignard-Rosez 1999)(Gobierno Vasco 1997).

b. Transmisión. El vector y reservorio de la *E. canis* es la garrapata café común del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Birchard y Sherding 1996). La garrapata se convierte en vector de esta enfermedad cuando ingiere sangre de perros infestados, adquiriendo el parásito en forma de larva o ninfa y transmitiéndola en forma de ninfa o adulto. Esta garrapata no es por tanto un verdadero reservorio ya que no se trata de una transmisión transovárica, la transmisión es transestadial (se da de un estadio a otro). Además del perro, como reservorio se encuentran otros cánidos como el zorro, el coyote y el chacal (Simón 2005).

En general, la ehrlichiosis canina se transmite por picadura de la garrapata *R. sanguineus*. Esta garrapata, al alimentarse de un perro con ehrlichiosis, puede ingerir glóbulos blancos con *Ehrlichia* en su citoplasma. Este hecho es mucho más frecuente si la garrapata se fija a perros en fase aguda de la enfermedad, ya que es en esta fase cuando se encuentran un mayor número de leucocitos infectados en sangre. El potencial de infección es muy alto, ya que de una vez que la garrapata ha ingerido sangre, ésta puede transmitir la infección hasta al menos 155 días después (Sainz 2000).

Las secreciones de las glándulas salivares de la garrapata constituyen la fuente de transmisión para el perro. Estas secreciones y la inflamación causada por la picadura parecen favorecer la llegada de leucocitos a ese lugar, facilitándose la entrada de *E. canis* en los mismos. La transmisión, como se mencionó con anterioridad, de *E. canis* en la garrapata es de tipo transestadial, es decir, de larva a ninfa y de ninfa a adulto, no transovárica (de una generación de garrapatas a la siguiente) (Sainz 2000). La ehrlichiosis, así como otras enfermedades producidas por rickettsias, pueden ser transmitidas por transfusiones con sangre contaminada (Birchard y Sherding 1996).

Existe un estudio que indica que la transfusión con sangre de perros con infección crónica, que habían contraído la infección 5 años antes, provocó enfermedad a los perros receptores. Por ello, es recomendable confirmar que los perros empleados como donantes sean negativos a ehrlichiosis (Sainz 2000). Así también, se ha comprobado que animales recuperados de la enfermedad se mantienen como reservorios en los cuales la enfermedad clínica puede volver a precipitarse al realizarse una esplenectomía (extracción del bazo) (Jubb y Kennedy 1970).

c. Patogenia. El período de incubación es de 7 a 21 días (Birchard y Sherding 1996). Desde el punto de vista clínico, la Ehrlichiosis canina se manifiesta en forma aguda, subaguda o subclínica y crónica (López *et al.* 1999). Puede ser extremadamente difícil de diagnosticar debido al amplio rango de síntomas que pueden ocurrir, por lo consecuente en la práctica clínica las tres fases no se diferencian fácilmente (Richards 2001).

La fase aguda de la ehrlichiosis es variable en duración (2 a 4 semanas) y en intensidad (leve a grave) (Birchard y Sherding 1996). Una vez que *E.canis* ha entrado en células mononucleares, se disemina por sangre o linfa, coincidiendo con la fase aguda de la enfermedad (Sainz 2000). El microorganismo se duplica en las células mononucleares, por medio de fisión binaria (Biberstein y Zee 1994), principalmente en el sistema fagocítico mononuclear de los nódulos linfáticos, bazo, hígado y médula ósea, dando como resultado hiperplasia que en la clínica se suele traducir en un aumento en el tamaño de estos órganos. La trombocitopenia (por destrucción periférica de plaquetas), con anemia o sin ella, y la leucopenia (o leucocitosis) es común durante esta fase (Birchard y Sherding 1996).

La fase subclínica se caracteriza por la persistencia del microorganismo después de la recuperación aparente de la fase aguda. Los perros pueden eliminar el microorganismo durante esta fase, o la infección progresa a la fase crónica (Birchard y Sherding 1996).

Además, *E.canis* se puede diseminar por un gran número de órganos (pulmón, riñones, meninges) en los que suele provocar lesiones inflamatorias y vasculitis, fundamentalmente de origen inmunomediado. En algunos casos, el cuadro puede desencadenar una coagulación intravascular diseminada que puede acabar con la vida del animal. Como consecuencia de la infección se produce una respuesta inmunitaria humoral importante que a menudo no es capaz de eliminar el agente patógeno. Este fenómeno suele presentarse en la fase subclínica de la enfermedad. Es especialmente frecuente la presencia de trombocitopenia y trombocitopatías motivadas fundamentalmente por procesos inmunomediados. Por la misma razón, en ocasiones se puede presentar leucopenia y anemia (ésta última también debida en ocasiones a la presencia de cuadros hemorrágicos) (Sainz 2000).

La fase crónica ocurre cuando el sistema inmunitario es ineficaz y el microorganismo no puede ser eliminado (Birchard y Sherding 1996). Algunos animales con buena respuesta celular pueden superar la infección sin necesidad de ser tratados; sin embargo, en la mayoría de los casos la enfermedad progresa a una fase crónica cuya severidad es variable. Esta severidad depende fundamentalmente del grado de afección de algunos órganos vitales. En este sentido, los casos con insuficiencia renal no suelen responder demasiado bien al tratamiento. Igualmente en ocasiones la médula ósea se puede afectar hasta el extremo de presentarse una aplasia medular que produce un cuadro de pancitopenia que suele desembocar en la muerte del animal. En principio no hay predisposición de raza, edad o sexo a presentar esta enfermedad, considerándose que la respuesta inmune de cada paciente juega un papel importante en la patogenia. En cualquier caso, se ha descrito que tanto el Pastor Alemán como el Springel Spaniel pueden presentar cuadros clínicos más graves, si bien este extremo no ha podido ser observado extensivamente (Sainz 2000). Así también, se ha reconocido como una enfermedad de los perros jóvenes y estos son los que a menudo mueren, aunque se puede dar en todas las edades (Runnells *et al.* 1982).

Se ha comprobado en estudios anteriores que la infección con *E. canis* es persistente. En un estudio de tres años, el DNA de *ehrlichia* fue amplificado por PCR de

4 de 6 perros clínicamente sanos no tratados, 34 meses después de la infección experimental con *E. canis*. El tratamiento de seis semanas con doxiciclina resultó en la desaparición del DNA de *ehrlichia* de 3 de los 4 perros positivos por PCR. Estos resultados probaron que perros clínicamente sanos en la fase subclínica de ehrlichiosis canina son acarreadores de la rickettsia, que la infección de *E. canis* puede persistir por años sin desarrollar la enfermedad crónica, y que algunos perros pueden eliminar el parásito y recuperarse de la ehrlichiosis sin tratamiento clínico (Harrus 1999).

d. Signos clínicos y anormalidades de laboratorio. La infección por *E. canis* no complicada es con frecuencia benigna y se caracteriza por fiebre moderada, abatimiento, inapetencia, pérdida de peso, palidez de mucosas, disnea y linfadenopatía. En la ehrlichiosis crónica grave, estos síntomas se agravarán mucho e irán unidos a la propensión a las hemorragias, incluso a la epistaxis (Biberstein y Zee 1994).

Los signos clínicos varían en las diferentes fases de la enfermedad:

Fase aguda: Los signos clínicos y los datos del examen físico son principalmente resultado de la hiperplasia diseminada del sistema fagocítico mononuclear y de anormalidades hematológicas. Por lo tanto, en la presentación clínica predominan signos como pirexia, linfadenopatía generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia, disnea o intolerancia al ejercicio debida a neumonitis, signos neurológicos causados por meningoencefalitis, y petequias y equimosis por trombocitopenia. Los títulos de anticuerpos pueden ser negativos durante esta fase, se requieren tres semanas para que se desarrollen títulos significativos (Birchard y Sherding 1996). La sintomatología de la ehrlichiosis canina es muy variada, especialmente durante la fase aguda la sintomatología suele ser poco específica por lo que el diagnóstico no siempre es sencillo (Sainz 2000). Las anormalidades hematológicas y bioquímicas incluyen trombocitopenia, anemia leve a intensa, leucopenia o leucocitosis, citología de la médula ósea hiper celular, hiperglobulinemia leve y elevaciones ligeras de la actividad de las enzimas hepáticas (Birchard y Sherding 1996).

Fase subclínica: Los pacientes están asintomáticos. Pueden identificarse cambios hematológicos y bioquímicos leves (Birchard y Sherding 1996).

Fase crónica: Los signos clínicos pueden ser leves o intensos, se desarrollan en 1 a 4 meses después de la inoculación del microorganismo, y reflejan las anomalías de la hiperplasia del sistema fagocítico mononuclear y hematológicas. Se puede observar cualquiera de los siguientes signos: pérdida de peso, pirexia, sangrado espontáneo, palidez debida a la anemia, linfadenopatía generalizada, hepatosplenomegalia, uveítis anterior y/o posterior (Birchard y Sherding 1996). Los signos neurológicos que se han relacionado con la ehrlichiosis son muy variados y pueden estar causados por meningitis debida a fenómenos inflamatorios o por hemorragias en sistema nervioso. Estos animales suelen presentar una respuesta rápida al tratamiento, recuperando por completo la funcionalidad neurológica (Sainz 2000). Las anomalías hematológicas y bioquímicas en general son pronunciadas e incluyen: monocitopenia, bicitopenia o pancitopenia debido a hipoplasia de la médula ósea; plasmocitosis de la médula ósea o esplénica; linfocitosis, en ocasiones compuestas de grandes linfocitos granulares; hiperglobulinemia, hipoalbuminemia y proteinuria (Birchard y Sherding 1996). Ocasionalmente aparecen signos locomotores, especialmente cojeras intermitentes, debido a la existencia de poliartritis que suele ser causada por un depósito de inmunocomplejos a nivel articular. En estos casos se pueden detectar cuerpos de inclusión de Ehrlichia en líquido sinovial. También se han descrito cuadros de polimiositis asociados a ehrlichiosis. Se puede encontrar en perros con ehrlichiosis una insuficiencia renal debido a glomerulonefritis inmunomediada parecida a la que aparece en leishmaniasis. La sintomatología cutánea asociada a esta enfermedad es fundamentalmente de tipo hemorrágico. No obstante, también se han descrito cuadros similares a los encontrados en reacciones de hipersensibilidad. Del mismo modo, se ha sugerido recientemente la asociación de la ehrlichiosis con la pioderma profunda del Pastor Alemán. Por último, la infertilidad en hembras y la presencia de abortos también se ha relacionado ocasionalmente con ehrlichiosis (Sainz 2000).

Aún así, la signología más frecuente presentada en los pacientes afectados por la enfermedad es epistaxis, pérdida de peso, palidez de mucosas, anorexia y depresión (Romano *et al.* 1998).

e. Analítica sanguínea y de orina. La alteración más típica detectada en perros con ehrlichiosis es la trombocitopenia que aparece aproximadamente en el 80% de los animales. También encontramos anemia (que, a menudo, es no regenerativa) y, con menos frecuencia, leucopenia. Aunque a la ehrlichiosis canina se la denominó en el pasado pancitopenia tropical canina, tan sólo el 15% de los perros enfermos presentan un descenso en el recuento de las 3 líneas celulares sanguíneas (Sainz 2000).

En relación con la bioquímica sanguínea, es habitual encontrar hiperproteinemia debida a un aumento de las beta y gamma-globulinas. También se suele presentar hipoalbuminemia asociada a proteinuria debido a glomerulonefritis. Ocasionalmente, la analítica sanguínea puede poner de manifiesto alteraciones motivadas por la existencia de una insuficiencia renal y/o hepática. En el urianálisis, las dos alteraciones más frecuentes son proteinuria y hematuria (Sainz 2000).

f. Diagnóstico. La mayoría de casos de ehrlichiosis monocítica en perros, ocurren en áreas endémicas durante los meses de primavera y verano cuando la población de garrapatas es más activa. Aún así esta enfermedad se presenta en todo el año. El diagnóstico de la enfermedad se basa en la anamnesis (historia clínica), presentación clínica, descubrimientos patológicos clínicos y confirmación por pruebas de laboratorio. Los dueños pueden reportar infestaciones de garrapatas anteriores o visitas recientes a un área endémica. El diagnóstico de la ehrlichiosis canina es confirmada por medio de la visualización de la mórula en monocitos circulantes (figura 1), detección de anticuerpos a *E. canis* en suero, o por la demostración del DNA de *E. canis* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Waner y Harrus 2000).

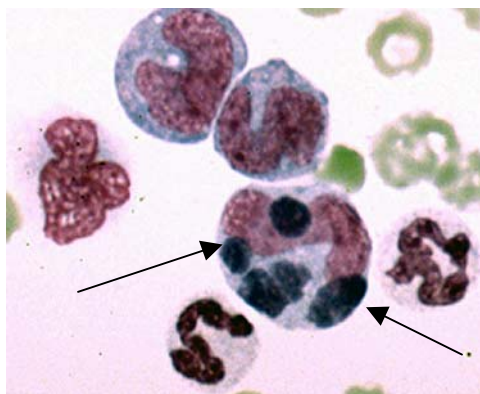


Fig. 1. Mórulas de *Ehrlichia canis* señalizadas con las flechas, en células mononucleares circulantes de un perro infectado (tinción Wright) (Bockino 2003).

El diagnóstico, como se mencionó anteriormente, se puede realizar observando mórulas o cuerpos de inclusión de *E. canis* en el citoplasma de linfocitos y monocitos en un frotis sanguíneo teñido con las técnicas habituales (May-Grünwald-Giemsa, Diff-Quick, etc.). Desgraciadamente, *E. canis* aparece transitoriamente en la sangre y, especialmente, durante la fase aguda por lo que son muchos los perros con ehrlichiosis en los que no encontramos estos cuerpos de inclusión, por lo que este diagnóstico es de baja sensibilidad (Sainz 2000). También se puede identificar el microorganismo en el bazo, nódulos linfáticos y pulmones, aunque es extremadamente poco probable, mediante aspiración con aguja delgada. A menudo hay plasmocitosis en estas muestras citológicas (Birchard y Sherding 1996).

El mejor método para el diagnóstico de la enfermedad es a través del examen del suero del perro usando la prueba de fluorescencia indirecta para anticuerpos (FIA) o ELISA, debido a la alta sensibilidad. Sin embargo, una prueba positiva solamente indica exposición (Richards 2001). En la actualidad existen en el mercado algunos tests comerciales de diagnóstico de ehrlichiosis basados en la técnica de ELISA. Así también, el Western-blot como el PCR, aunque no son técnicas habitualmente accesibles para el clínico, son especialmente útiles en casos dudosos y para distinguir entre las distintas especies de *Ehrlichia*, para lo que también es útil ELISA (Sainz 2000).

También puede realizarse una técnica de cultivo sencilla que consiste en la incubación del sobrenadante o de una muestra de sangre heparinizada colocada sobre cubreobjetos dentro de tubos para cultivo celular, de Leighton (Biberstein y Zee 1994).

g. Aspectos inmunológicos. Se sospecha que las respuestas autoinmunes celular y humoral frente a las células mononucleares y plaquetas infectadas cooperan en la destrucción de los glóbulos rojos y en la disminución de la actividad de la médula ósea. La resistencia a la superinfección, debida a anticuerpos y a células, parece ser que depende de la persistencia de la infección (Biberstein y Zee 1994).

h. Tratamiento. La tetraciclina, y su derivado doxiciclina, son los fármacos de elección para perros con ehrlichiosis. El clorafemicol también es eficaz, pero su confiabilidad es cuestionable en perros con citopenia (Birchard y Sherding 1996). El tratamiento de elección para la fase aguda de la ehrlichiosis canina es la doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg una vez por día (o 5 mg/kg dos veces por día) durante tres semanas como mínimo. Un tratamiento a corto plazo con doxiciclina (10 mg/kg, una sola toma diaria durante 7 días) no ha tenido buenos resultados, mientras que la administración durante 10 días es de mayor éxito. Aún así, 10 días de tratamiento puede no ser suficiente para todos los casos agudos. En la mayoría de los casos, los perros en la fase aguda de la enfermedad, responden al tratamiento y muestran mejorías clínicas dentro de las 24 a 72 horas (Waner y Harrus 2000). La doxiciclina debe administrarse con el estómago vacío (Birchard y Sherding 1996).

Otro fármaco empleado en el tratamiento de ehrlichiosis canina es el dipropionato de imidocarb, administrado a una dosis de 5mg/kg vía subcutánea y repetida en 14 días. Este ha sido altamente eficaz en perros con infecciones mixtas por *E. canis* y *Babesia canis* (Birchard y Sherding 1996). Con relativa frecuencia se presentan efectos secundarios como disnea, sialorrea, diarrea, exudado nasal y taquicardia, que parecen ser debidos a un efecto anticolinesterasa del fármaco (Sainz 2000).

En la práctica clínica, en aquellos casos que presentan un cuadro severo, frecuentemente se instaura un tratamiento combinado a base de doxiciclina y de imidocarb. No se ha observado diferencias significativas al comparar la eficacia terapéutica observada al tratar casos sólo con doxiciclina, sólo con imidocarb y con ambos fármacos a la vez. El pronóstico de la mayoría de los casos es muy bueno, respondiendo favorablemente al tratamiento en 24-72 horas. La mayoría de los casos que no responden presentan insuficiencia renal y/o aplasia medular severa (Sainz 2000).

Los parámetros que más rápidamente se normalizan son los recuentos de eritrocitos y de plaquetas. Muchos perros tratados, especialmente aquellos que presentan títulos altos, experimentan ligeros descensos en el título de anticuerpos tras el tratamiento pero continúan siendo positivos durante largos períodos de tiempo (incluso varios años) sin ninguna otra alteración clínica ni laboratorial. Aún queda por determinar el significado real de esta persistencia en el título de anticuerpos en algunos casos (Sainz 2000).

Recientemente se ha propuesto el uso de enrofloxacin para el tratamiento de la ehrlichiosis canina a dosis de 5 mg/kg cada 24 horas durante 15 días. Sin embargo, otros ensayos han mostrado la falta de respuesta de perros con ehrlichiosis a este fármaco por lo que son necesarios más estudios clínicos que aclaren la efectividad real de este producto en este proceso. En muchos casos no suele ser necesario instaurar un tratamiento de apoyo y sólo con la terapia específica se suele conseguir una buena respuesta. No obstante, en casos con anemia severa, están indicadas las transfusiones sanguíneas. Debido a la dificultad con la que, a veces, nos encontramos para diferenciar la ehrlichiosis de otras anemias y/o trombocitopenias inmunomediadas o autoinmunes, en la práctica inicialmente se puede instaurar un tratamiento combinado con corticoides, a la espera de los resultados serológicos (Sainz 2000).

El tratamiento de la forma crónica severa de la enfermedad no es grato y el pronóstico de esos perros pancitopénicos es grave. Hay un solo caso descrito de tratamiento exitoso en un perro con ehrlichiosis monocítica canina severa crónica, usando

una combinación de factores de crecimiento hematopoyéticos, bajas dosis de vincristina, doxiciclina y una terapia prolongada con glucocorticoides. No obstante, el uso de factores de crecimiento en el tratamiento de la ehrlichiosis crónica no ha sido probado eficazmente y requiere ser investigado (Waner y Harrus 2000).

i. Profilaxis. El control de la garrapata constituye el punto principal para la prevención de la ehrlichiosis (Birchard y Sherding 1996). Existen en el mercado múltiples productos para su empleo en el perro (Sainz 2000). Pueden usarse dosis bajas de tetraciclina o doxiciclina en áreas endémicas durante la temporada de garrapatas (Birchard y Sherding 1996). Aunque esta medida de prevención, presenta la controversia de la posibilidad de ocasionar resistencia (Sainz 2000).

En otras enfermedades transmitidas por garrapatas, parece necesario para que se produzca la transmisión, que la garrapata este fijada al menos durante 24 horas, por lo que, se debe intentar la retirada precoz de las garrapatas (Sainz 2000).

4. Epidemiología. La infección natural por *Ehrlichia* se ha encontrado en gran cantidad de perros alrededor del mundo entero, tanto perros domésticos como callejeros. Se sabe que otros cánidos como el zorro, el coyote y el chacal pueden presentar esta enfermedad (Simón 2005).

a. Reservorios y vectores. El perro y otros cánidos (zorro, coyote y chacal) actúan como reservorio del parásito (Simón 2005). Se ha comprobado en estudios anteriores que la infección con *E. canis* es persistente. Es decir, se ha probado que los perros clínicamente sanos en la fase subclínica de ehrlichiosis canina son acarreadores de la rickettsia y que la infección de *E. canis* puede persistir por años sin desarrollar la enfermedad crónica (Harrus 1999). Por lo que algunos perros se convierten en acarreadores de ésta por un largo tiempo. Existe un estudio que indica que la transfusión con sangre de perros con infección crónica, que habían contraído la infección 5 años antes, provocó enfermedad a los perros receptores (Sainz 2000).

El vector y reservorio es también la garrapata café común del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 2). La cual transmite el microorganismo por lo menos durante cinco meses posinchantamiento (Birchard y Sherding 1996). El potencial de infección es muy alto, ya que esta garrapata puede transmitir la enfermedad largo tiempo después de haber ingerido la sangre infectada y así también los perros pueden acarrearla por largos períodos de tiempo (Sainz 2000).



Fig. 2. Garrapata café del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, vector de *E. canis* (Rey 2002).

1) Biología del vector. *Rhipicephalus sanguineus* es una garrapata dura que ataca a los animales y al hombre causándoles lesiones epidérmicas, irritación, malestar y anemia. Su rol como agente trasmisor de enfermedades en diferentes partes del mundo lo coloca en una posición de parásito peligroso para la sanidad animal y humana (Drugueri 2004).

Taxonómicamente se puede clasificar esta especie de la siguiente manera:

Phylum: Arthropoda

Clase: Arácnida

Orden: Acarina

Familia: Ixodidae

Género: *Rhipicephalus*

Especie: *Rhipicephalus sanguineus* (Drugueri 2004).

R. sanguineus es vulgarmente conocida como la "garrapata café del perro" o "garrapata parda del perro" o "garrapata de las perreras" y se encuentra distribuida por todo el mundo, siendo la más común dentro del género. Otras especies dentro del género *Rhipicephalus* se encuentran distribuidas en forma más localizada por países europeos, africanos y asiáticos (Drugueri 2004).

Los hospedadores de esta especie de garrapata dura son los cánidos domésticos y salvajes, los ovinos, los caprinos, los camélidos, y animales salvajes como las liebres y los erizos. Pero es en los perros donde *R. sanguineus* encuentra a su hospedador más importante (Drugueri 2004).

La hematofagia es continua y lenta. Son parásitos hematófagos, pero como las dos mudas que sufren tienen asiento en el medio ambiente, necesitan de tres hospedadores (pudiendo ser el mismo individuo) para cumplir un ciclo biológico completo (Drugueri 2004).

2) Ciclo biológico del vector. La hembra deposita, aglutina y esconde en el medio ambiente los huevos en grupos de 2500 y 3000 por vez, gracias a la secreción protectora de una glándula que ella posee. De éstos, luego de un período de incubación que va desde los 21 a los 27 días en verano y hasta 80 días en invierno, nacen las larvas. Estas tienen 3 pares de patas y deben subirse al perro hospedador para poder alimentarse de su sangre. Una vez que alcanzó la piel del hospedador se alimentan, caen al suelo y mudan en el medio a ninfas en aproximadamente 9 días. Estas últimas poseen 4 pares de patas, son también hematófagas, y deben subirse otra vez al hospedador para poder alimentarse de sangre y así repletarse de sangre, caer al suelo y allí transformarse en machos a los 4.5 días y en hembras a los 5.5 días (Drugueri 2004).

En el estadio adulto hay dimorfismo sexual, la hembra es mucho más grande que el macho. Los adultos son también hematófagos, por lo tanto van a necesitar subirse otra vez al hospedador para poder succionar su sangre. Una vez alcanzada la madurez sexual las garrapatas copulan y la hembra debe alimentarse hasta que se llena de sangre, luego cae al suelo y busca un lugar protegido para poner los huevos. Una vez que los depositó la hembra muere. El macho generalmente no se alimenta de sangre (Drugueri 2004).

La duración del ciclo varía dependiendo de las condiciones climáticas, ya que dependiendo de éstas las larvas pueden o no estar más o menos tiempo esperando al hospedador. En cambio la parte del ciclo que se cumple sobre el animal (ciclo de vida

parasitaria) no varía ya que las condiciones ambientales las crean la humedad y calor del cuerpo del can y es de 23-24 días (Drugueri 2004).

3) Distribución del vector en Guatemala. Aparentemente la garrapata *R. sanguineus*, se encuentra distribuida en todo el país (IICA/MAGA 1988). Pero se concentra mayormente en los departamentos de El Petén, Alta Verapaz, Huehuetenango, Izabal, El Progreso, Guatemala, Santa Rosa, Escuintla y Suchitepéquez (PRODESA/MAGA 1988).

4) Identificación del vector. Es una especie de garrapata dura, o sea que posee escudo dorsal y la superficie dorsal de su cuerpo es lisa, con festones en el borde posterior. Los peritremas están detrás del cuarto par de patas y el orificio genital está entre las coxas del segundo par de patas. El dimorfismo sexual es evidente ya que la hembra mide entre 10 y 12 mm, posee el abdomen de color de blanquecino a marrón y es más blanda; mientras que el macho mide entre 3 y 4 mm es más duro y de color marrón (Drugueri 2004).

Esta garrapata es conocida por la transmisión de la Piroplasmosis, Parálisis por Garrapatas, Fiebre Q, Fiebre de las Montañas Rocosas, Tularemia y Ehrlichiosis (Drugueri 2004).

R. sanguineus se distingue de las demás especies de garrapatas por varias características morfológicas, pero la más importante para su reconocimiento práctico es la bifurcación marcada de la Coxa I (figura 3). Esto debido a que esta especie es la única que presenta una bifurcación tan marcada (Rodríguez, E.; Jefe de Cátedra, Departamento de Parasitología, USAC, febrero 2006 comunicación personal).

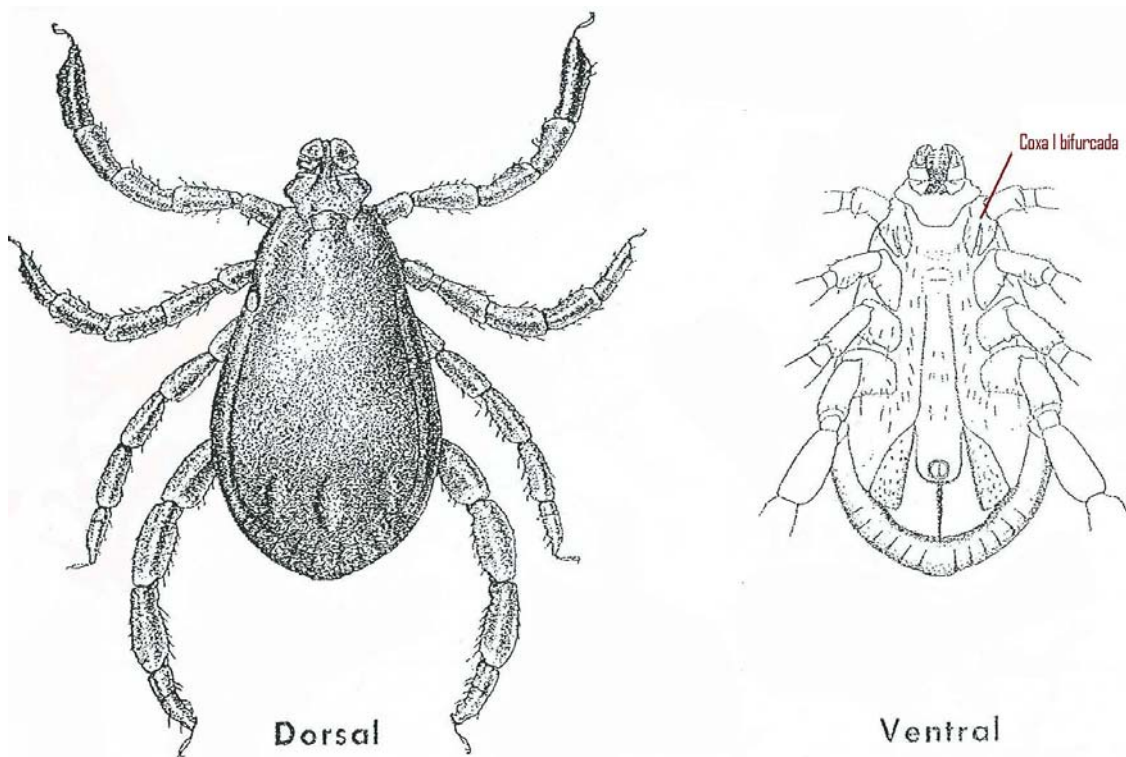


Figura 3. *Rhipicephalus sanguineus* se identifica de las demás especies de garrapatas observando bajo un estereoscopio la parte ventral de esta, e identificando la Coxa I. Esta debe de presentar una bifurcación bastante marcada (Depto. Parasitología, FMVZ, USAC 2006).

b. Distribución geográfica e incidencia. La infección se concentra en las latitudes tropicales y subtropicales, si bien se presenta en todos los continentes excepto en Australia (Biberstein y Zee 1994). Debido a su naturaleza crónica e insidiosa, la ehrlichiosis es prevalente durante todo el año más que sólo durante los meses calurosos (Birchard y Sherding 1996).

En los estudios realizados en otros países, se ha encontrado una prevalencia variable, por ejemplo: Barcelona 4%, Tennessee 11%, Israel 30%, Egipto 33%, Bulgaria 37.25%, Zimbawe 42%, Mississippi 53%, Mexicali (Baja California) 93.3%, etc. Así también se ha reportado la presencia de *E. canis* en otros países, como Brasil, Chile, etc., en los cuales no se ha realizado un estudio de prevalencia o no se ha publicado mundialmente (Roura *et al.* 2005)(Romano *et al.* 1998)(Reaman *et al.* 2004)(Vignard-Rosez 1999)(Waner y Harrus 2000)(Tsachev y Kontos 2004)(Corner y Farris-Smith 1986)(Lopez *et al.* 1999).

B. Justificación

Siendo la Ehrlichiosis una zoonosis que se cree de distribución tropical y subtropical, es importante contar con estudios en cada país sobre la presencia de la misma, para poder tomar las medidas sanitarias adecuadas. Puesto que en Guatemala no existe ningún estudio al respecto, y habiéndose ya comprobado su presencia en varios países aledaños como los son México y Estados Unidos es muy probable su presencia en este país, sobre todo ya que se ha comprobado la presencia del vector de la enfermedad ampliamente distribuido en Guatemala.

Debido a que el perro convive muy estrechamente con el humano, es importante conocer que zoonosis que afectan al perro existen en las diferentes áreas del país, para tomar las medidas profilácticas necesarias.

Por haber sido Ciudad San Cristóbal una finca de pastoreo de vacas, se reporta problema de garrapatas en los perros de las casas de dicho sector, por lo tanto existe alta probabilidad de encontrar anticuerpos de Ehrlichia en esta área.

A la medicina veterinaria le es de gran ayuda saber el diagnóstico de la ehrlichiosis, así como la relación de la sintomatología clínica con la presencia de la enfermedad y los tratamientos específicos para ésta.

Biológicamente es de gran importancia conocer la distribución de *R. sanguineus* en Guatemala, ya que es vector de varias enfermedades para diferentes especies animales, por lo que se comprobó la presencia de ésta en Ciudad San Cristóbal.

Para los estudios biológicos sobre la densidad de las poblaciones animales es de importancia conocer las rickettsias que inciden sobre éste, en este caso las bacterias Gram negativo que causan la ehrlichiosis canina.

Las enfermedades infecciosas inciden directamente en la reproducción, distribución y densidad de las distintas poblaciones animales, por lo que es importante su estudio a nivel biológico.

C. Objetivos

1. General

- Detección de *Ehrlichia canis* en perros de Ciudad San Cristóbal, Mixco, Guatemala.

2. Específicos

- Detección de anticuerpos de *Ehrlichia canis* en perros de Ciudad San Cristóbal, Mixco, Guatemala.
- Comprobar que la garrapata que parasita a la mayoría de los perros en Ciudad San Cristóbal, Mixco, Guatemala, es *Rhipicephalus sanguineus*.
- Relacionar síntomas clínicos con la presencia de anticuerpos de ehrlichiosis. Uso de Ensayo Inmunsorbente de Enzima Ligada (ELISA) para el diagnóstico de anticuerpos para *Ehrlichia canis*.

D. Hipótesis

Los perros de Ciudad San Cristóbal, en el departamento de Guatemala, poseen anticuerpos circulantes contra *Ehrlichia canis*, debido al contacto con el vector de esta enfermedad (*Rhipicephalus sanguineus*).

II. MÉTODOS

A. Área de estudio

El proyecto de investigación se llevó a cabo en la Clínica Veterinaria Ixchel, con perros de Ciudad San Cristóbal, en el municipio de Mixco del departamento de Guatemala (Figura 4).

Ciudad San Cristóbal comenzó a lotificarse en los años 60. Estaba formada por varias fincas ganaderas de las familias Herrera, Mansilla y Aguilar. Y actualmente constituye la zona 8 del municipio de Mixco, del departamento de Guatemala (Burbano, E.; Gerente de Ventas, Deinco de Ciudad San Cristóbal, febrero 2006 comunicación personal).

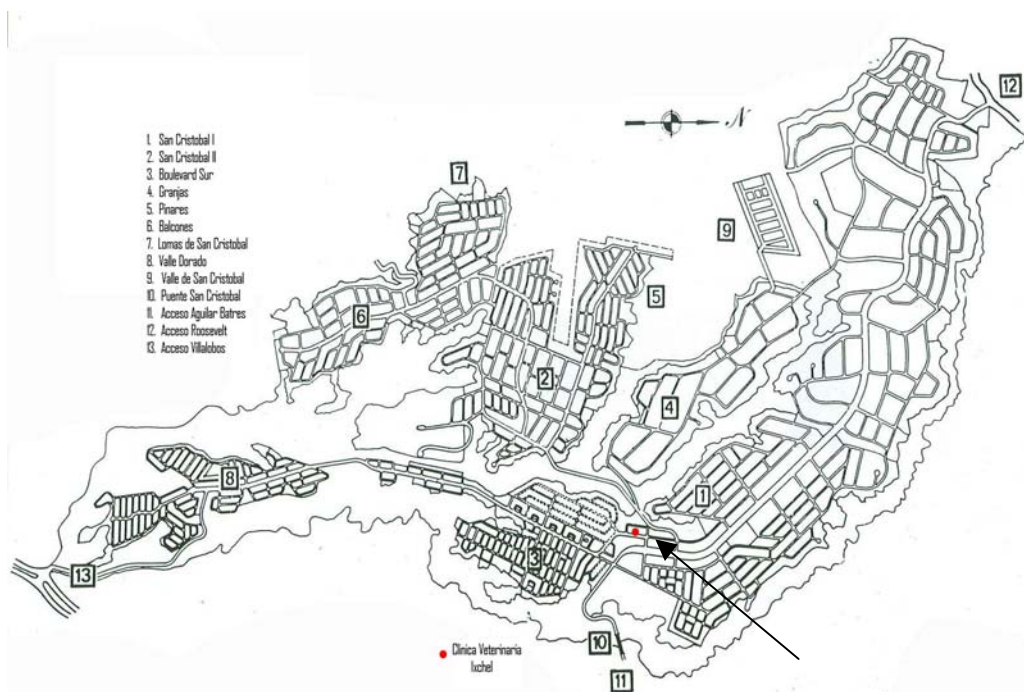


Figura 4. Mapa de Ciudad San Cristóbal, departamento de Guatemala, Municipio de Mixco, zona 8. Se señalan las entradas principales, las distintas áreas de Ciudad San Cristóbal y la ubicación de la Clínica Veterinaria Ixchel (Burbano, E.; Gerente de Ventas, Deinco de Ciudad San Cristóbal, febrero 2006 comunicación personal).

B. Selección de muestra

La población estuvo constituida por 850 perros tratados en la Clínica Veterinaria Ixchel con problemas ocasionados por garrapatas en el último año (02 de enero del 2005 a 31 de enero del 2006) (Ellgutter 2006).

La muestra se constituyó de 86 perros de la población descrita anteriormente. Esta cantidad fue obtenida a través de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z^2)(Npq)}{(Z^2 pq) + (NE^2)}$$

Donde:

- p = probabilidad,
- q = 1 – p,
- Z = confianza,
- E = error,
- N = no. de animales (población), y
- n = no. de animales a muestrear

ej:

$$n = \frac{(1.96)^2 (850)(0.5)(0.5)}{(1.96)^2 (0.5)(0.5) + (850)(0.1)^2} = 86.29 = 86 \text{muestras}$$

(Camey, C.; Médico Veterinario, Departamento de Bioestadística, USAC, febrero 2006 comunicación personal).

A cada uno de los perros muestreados se les llevó un registro de la fecha de muestreo, de los síntomas que presentaron (si es que presentaron), su sexo, raza, edad y área de procedencia.

C. Extracción e identificación de las garrapatas

Algunos de los perros de los cuales se obtuvo el suero aún tenían problemas de garrapatas, por lo que en estos casos, se tomaron muestras para la identificación de las mismas. Así se comprobó la presencia del vector en San Cristóbal.

La extracción de las garrapatas de los perros se efectuó tomándola con los dedos y girándola de atrás para adelante, así la garrapata se desprende con facilidad y se evita que la cabeza o hipostomas se queden prendidos, o que se lesione la piel del perro (Rodríguez, E.; Jefe de Cátedra, Departamento de Parasitología, USAC, febrero 2006 comunicación personal).

Para la identificación de *R. sanguineus*, se tomó ésta y bajo un estereoscopio se observó el vientre. La Coxa I (anexo II) debe de presentar una bifurcación bien marcada (figura 3) característica que diferencia a esta garrapata de las demás especies (Rodríguez, E.; Jefe de Cátedra, Departamento de Parasitología, USAC, febrero 2006 comunicación personal).

D. Obtención de muestras de sangre

La muestra de sangre se obtuvo de la vena cefálica de las extremidades anteriores (figura 5.a) o de la safena de las extremidades posteriores del perro (figura 5.b). Se ligó la extremidad a nivel del codo para que la vena resalte (figura 5.a), si la vena no es muy prominente se rasuró el área (Niemand 1984).

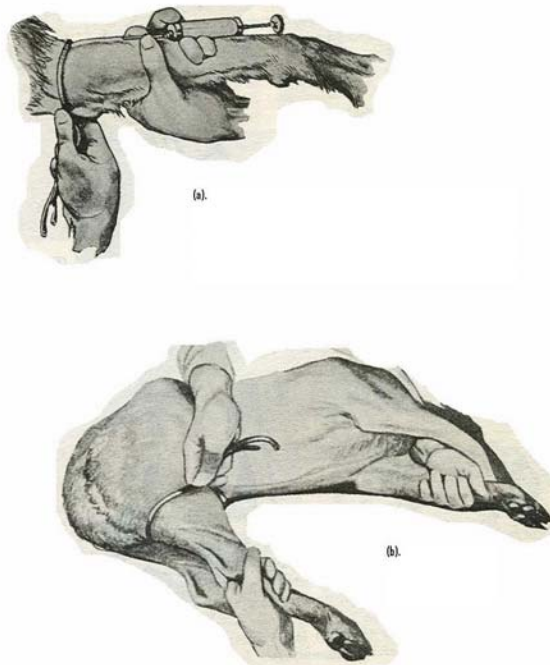


Figura 5. (a). Se muestra la vena cefálica de una de las patas anteriores del perro. Una mano sujeta la extremidad y mantiene la jeringuilla y la aguja, mientras que la otra sujeta la ligadura. Aunque para mayor facilidad la ligadura puede sujetarse con una pinza y así con una mano sujetar la extremidad y con la otra la jeringa y la aguja. (b). Vena safena de una de las extremidades posteriores del perro, así también se muestra como se sujeta al perro y como se liga la pata (Niemand 1984).

La aguja se metió pegada a la piel con el bisel hacia arriba. Para la recolección de sangre se empleó la técnica de toma de muestras al vacío con tubos vacutainer. La aguja de doble punta se enroscó en el capuchón, luego se insertó en el tubo sin perforar totalmente el tapón. Al tenerse canalizada la vena se presionó totalmente el tubo hasta perforar completamente el tapón para que así la sangre fluyera dentro del tubo. Al obtener la cantidad deseada (aproximadamente 5mL, dependió del perro) se retiró la liga, se hizo presión sobre la vena para evitar que continuara sangrando y se retiró la aguja. Se dejó el tubo reposando horizontalmente durante 30 minutos para que se formara el coágulo (Ellgutter, E.; Médico Veterinario, Clínica Veterinaria Ixchel Ciudad San Cristóbal, 2006 comunicación personal).

E. Separación y extracción de suero

Al formarse el coágulo se pesó el tubo con una balanza en gramos, para así colocar el contrapeso en la centrifugadora (ROTOFIX). Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos para así poder separar el suero del plasma. La parte superior de color semi-transparente, el suero, se tomó con una pipeta pasteur y se almacenó en un vial de rosca de 2ml (Barillas, F.; Médico Veterinario, Clínica Veterinaria Exotic Zona 10, Febrero 2006 comunicación personal).

F. Almacenamiento

El almacenamiento se llevó a cabo en viales de rosca de 2ml. En primera estancia se almacenaron en un congelador a -5°C en la Clínica Veterinaria Ixchel, no más de una semana. Luego se transportaron en una hielera, a un congelador de -20°C en la Universidad del Valle de Guatemala, en donde se guardaron hasta comenzar las pruebas con las pruebas de diagnóstico.

G. Realización de prueba de diagnóstico

Todos los sueros fueron procesados a través de un kit canino comercial de ELISA para la prueba de antígenos de *Dirofilaria immitis* y anticuerpos de *Borrelia burgdorferi* y de *Ehrlichia canis*, Kit SNAP 3Dx de IDEXX Labs, Inc. (IDEXX Labs, Inc. 2002).

1. Principio de la prueba. El kit de prueba para antígenos del gusano del corazón/anticuerpo de *Borrelia burgdorferi*/anticuerpo de *E. canis* de SNAP es un inmunoensayo de enzimas para la detección simultánea del antígeno de *D. immitis*, el anticuerpo de *B. burgdorferi* y anticuerpo de *E. canis* en sangre total, suero o plasma de los canes. La enfermedad del gusano del corazón es ocasionada por el nemátodo filarial *D. immitis* y se encuentra expandida por todo el mundo. El insecto vector para *D. immitis* es el mosquito. La detección del antígeno del gusano del corazón es el diagnóstico para la infección ocasionada por *D. immitis*. El agente causante de la enfermedad de Lyme ha

sido identificado como la espirocheta *B. burgdorferi* transmitida por la garrapata. Es posible realizar una evaluación de la exposición de *B. burgdorferi* por medio de la medición del anticuerpo canino específico para ésta. La ehrlichiosis canina es una enfermedad de perros transmitida por garrapatas portadoras del parásito rickettsioso *E. canis*. El diagnóstico de la ehrlichiosis canina se ha realizado mediante la observación de señales clínicas típicas y por la medición de un título de anticuerpo significativo para *E. canis*. Un resultado positivo en la prueba SNAP de anticuerpos *E. canis* indica que hay un título de anticuerpos significativo para *E. canis*. Las tres enfermedades en cuestión tienen largos períodos de manifestación sub-clínica y presentan signos muy vagos, por esta razón es de gran ayuda el empleo de este tipo de examen (IDEXX Labs, Inc. 2002).

Los componentes del kit son: Un frasco de Anti-HTWM/*B. burgdorferi*/*E. canis* HRPO, dispositivos de prueba (conteniendo la solución de lavado y solución de sustrato), pipetas de transferencia, tubos de muestra y rejilla de reactivos (IDEXX Labs, Inc. 2002).

2. Procedimiento. Los dispositivos SNAP (figura 6) y los reactivos para la prueba son estables hasta su fecha de vencimiento cuando se almacenan a 2-7°C. Si se almacena a temperatura ambiente 15-27°C, los dispositivos SNAP y los reactivos son estables durante 90 días o hasta la fecha de vencimiento impresa, cualquiera que ocurra primero. Una vez los dispositivos SNAP y los reactivos se sacan del almacenamiento de 2-7°C durante más de 24 horas, la fecha de vencimiento es de 90 días o la fecha de vencimiento impresa, cualquiera que ocurra primero. Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente antes de que se realice la prueba. Esto puede tardar unos 30 minutos, dependiendo de la temperatura del laboratorio, no se debe calentar (IDEXX Labs, Inc. 2002).

1. A la hora en que se utilizaron los sueros, las muestras más antiguas o previamente congeladas se centrifugaron antes de emplearlas.

2. Se usó la pipeta proporcionada, para transferir tres gotas de muestra (sangre entera, suero o plasma) al tubo de muestra de tapa azul proporcionado con el kit (figura 6.a).
3. Se mantuvo el frasco conteniendo el conjugado, **en posición vertical**, y se añadieron cuatro gotas de conjugado al tubo conteniendo la muestra.
4. Se tapó el tubo conteniendo la muestra y el conjugado, y se mezcló bien invirtiendo el tubo de tres a cinco veces.
5. Se colocó el dispositivo sobre **una superficie plana**. Se le añadió el contenido del tubo a la cubeta de muestra (figura 6.b), teniendo cuidado de no salpicar el contenido fuera de la cubeta. La muestra fluyó a través de la ventanilla de resultados llegando al círculo de activación (figura 6.b) en 30 a 60 segundos aproximadamente. Parte de la muestra pudo quedar en la cubeta de muestra.
6. Cuando comenzó a aparecer color en el círculo de activación se pulsó firmemente el activador (figura 6.b) hasta que estuviera a nivel con el cuerpo del dispositivo. NOTA: algunas muestras no fluyeron al círculo dentro de los 60 segundos y, por consiguiente, el círculo no se coloreó. En este caso, se pulsó el activador después que la muestra hubiera pasado a través de la ventanilla de resultados.
7. Se leyó el resultado de la prueba a los ocho minutos. Nota: el control positivo se desarrolló más pronto, pero los resultados no se completan hasta los ocho minutos.
8. Para determinar el resultado de la prueba, se leyeron las colonias de reacción en la ventanilla de resultados (figura 6.b). Si no hubo desarrollo de color en la colonia del control positivo (figura 6.c) debió repetirse la prueba. Si solamente apareció color en la colonia de control positivo significa un resultado negativo. Si apareció color en el control positivo y en alguno de los indicadores de una, de dos o de las

tres enfermedades significa un resultado positivo hacia la/s enfermedades con color (figura 6.c) (IDEXX Labs, Inc. 2002).

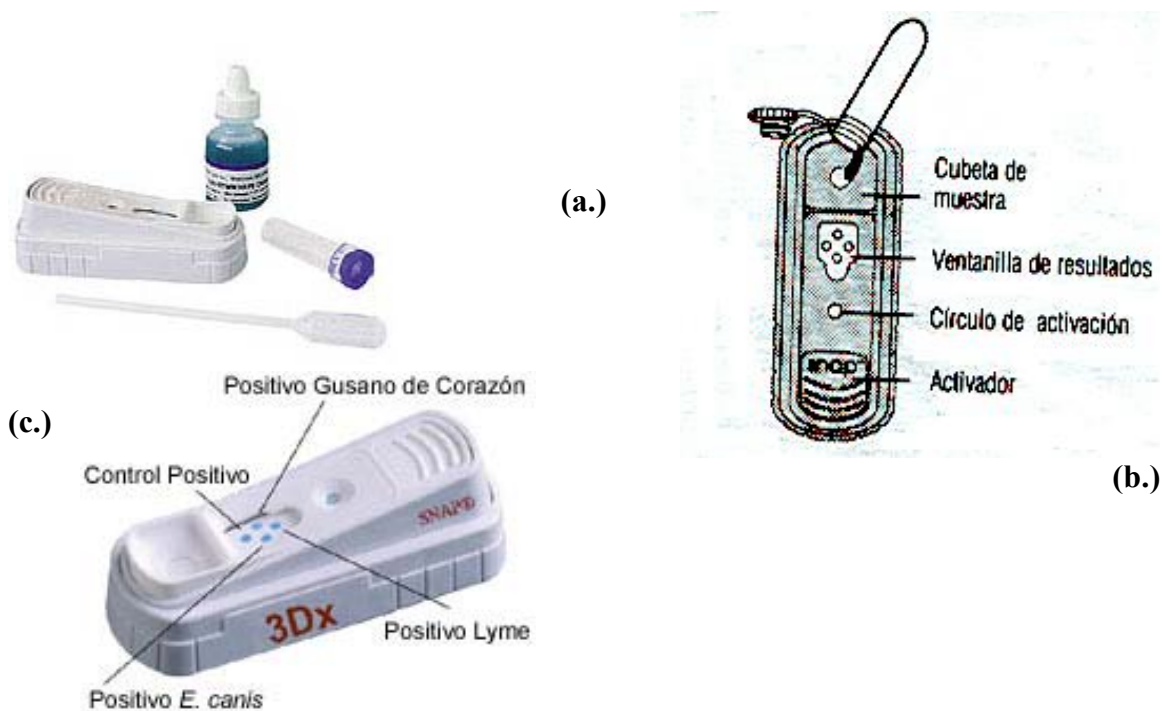


Figura 6. (a.) Se muestran los componentes de la prueba Snap 3Dx de IDEXX Labs, Inc. los cuales son: una pipeta de transferencia por prueba, un tubo de muestra (tapadera azul), un frasco conteniendo el anti-HTWM/*B. burdorferi*/*E. canis* HRPO y un dispositivo de prueba. (b.) Un dispositivo de prueba Snap con sus partes respectivas. (c.) Un dispositivo de prueba Snap mostrando los indicadores de las colonias de las tres enfermedades, Gusano del corazón, Lyme y *E. canis* (IDEXX Labs, Inc. 2002).

H. Análisis de resultados

Se analizaron los resultados tomando en cuenta la edad, raza y sexo. Así también si el paciente presentó o no algún síntoma u otra enfermedad. Se obtuvo una prevalencia normal, es decir un porcentaje de prevalencia de la enfermedad en San Cristóbal. Así también se realizó un chi-cuadrado, tomando como variables dependientes la seropositividad a *E. canis* y como variables independientes la edad, sexo, raza, procedencia, etc. Se tomaron como control negativo cuatro perros extra, a los que se les corrió la prueba, que nunca habían sido infestados por garrapatas.

III. RESULTADOS

A. Identificación de garrapatas

Se identificaron alrededor de 60 garrapatas, tomadas como muestras de los perros que aún presentaban infestación de éstas. No se encontró ninguna otra especie de garrapata entre las observadas, además de *R. sanguineus*.

B. Prueba de diagnóstico ELISA para *E. canis*

Se realizaron 86 pruebas de diagnóstico de ELISA para la prueba de antígenos de *Dirofilaria immitis* (gusano del corazón) y anticuerpos de *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) y de *Ehrlichia canis* (ehrlichiosis canina). No se obtuvo ninguna de las pruebas como positiva hacia la enfermedad de Lyme y la del gusano del corazón.

Para los anticuerpos de *E. canis* en las pruebas, se encontraron siete positivos de los 86 casos observados. Esto dando una prevalencia de 8.14%.

De los 86 individuos en la muestra, 39 fueron hembras y 47 machos. De los siete casos positivos cinco de éstos fueron machos y dos hembras (cuadro 2). Se determinó que no hay asociación entre el sexo de los perros muestreados y la presencia de anticuerpos circulantes contra *E. canis* ($\chi^2 = 70.85$, 1g.l., $P < 0.05$).

Cuadro 2. Distribución por sexo de los individuos muestreados para la determinación de la presencia anticuerpos contra *E. canis*, a través de la prueba ELISA Snap.

Sexo	Prueba de ELISA				Total	% sexo
	Positivos	%	Negativos	%		
Hembras	2	2.33	37	43.02	39	45.35
Machos	5	5.81	42	48.84	47	54.65
Total	7	8.14	79	91.86	86	100

Se determinó que no hay asociación entre la raza de los individuos muestreados y la positividad a la prueba ELISA de anticuerpos contra *E. canis* ($\chi^2 = 0.85$, 4g.l., $P < 0.05$). Debido a la relación entre la cantidad de individuos de cada raza encontrados en toda la muestra y en los positivos (cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución por raza de los individuos muestreados para la determinación de la presencia anticuerpos contra *E. canis*, a través de la prueba ELISA Snap.

Raza	Prueba de ELISA				Total	% Raza
	Positivos	%	Negativos	%		
Pastor Alemán	2	4.87	6	14.63	8	19.51
Labrador	1	2.43	3	7.31	4	9.75
Pastor Belga	1	2.43	0	0	1	2.43
French Poodle	2	4.87	14	34.14	16	39.02
Cocker	1	2.43	11	26.82	12	29.26
Total	7	17.07	34	82.92	41	100

Los siete perros positivos se encontraron en un amplio rango de edades, por lo que se separaron las distintas edades en tres categorías: a. Juveniles, los perros de ≤ 3 años; b. Edad mediana > 3 y ≤ 8 años; c. Mayores > 8 años (cuadro 4). Con lo que se determinó que no hay asociación entre la edad de los individuos muestreados y la presencia de anticuerpos contra *E. canis* ($\chi^2 = 2.003$, 2g.l., $P < 0.05$).

Cuadro 4. Distribución por edad de los individuos muestreados para la determinación de la presencia anticuerpos contra *E. canis*, a través de la prueba ELISA Snap.

Edad	Prueba de ELISA				Total	% edad
	Positivos	%	Negativos	%		
Pequeña	1	1.162791	24	27.90698	25	29.06977
Mediana	2	2.325581	30	34.88372	32	37.2093
Grande	4	4.651163	25	29.06977	29	33.72093
Total	7	8.139535	79	91.86047	86	100

La muestra fue tomada de una población de perros de Ciudad San Cristóbal, la cual se encuentra separada en varias colonias. Los siete casos positivos procedieron de las siguientes: Dos de Granjas, dos del Sector B-1, uno del Sector B-2, uno de Balcones y uno de Pinares (figura 7). Se determinó que no hay asociación entre la procedencia (cuadro 5) de los individuos muestreados y la positividad a la prueba ELISA de anticuerpos contra *E. canis* ($\chi^2 = 0.85$, 4g.l., $P < 0.05$).

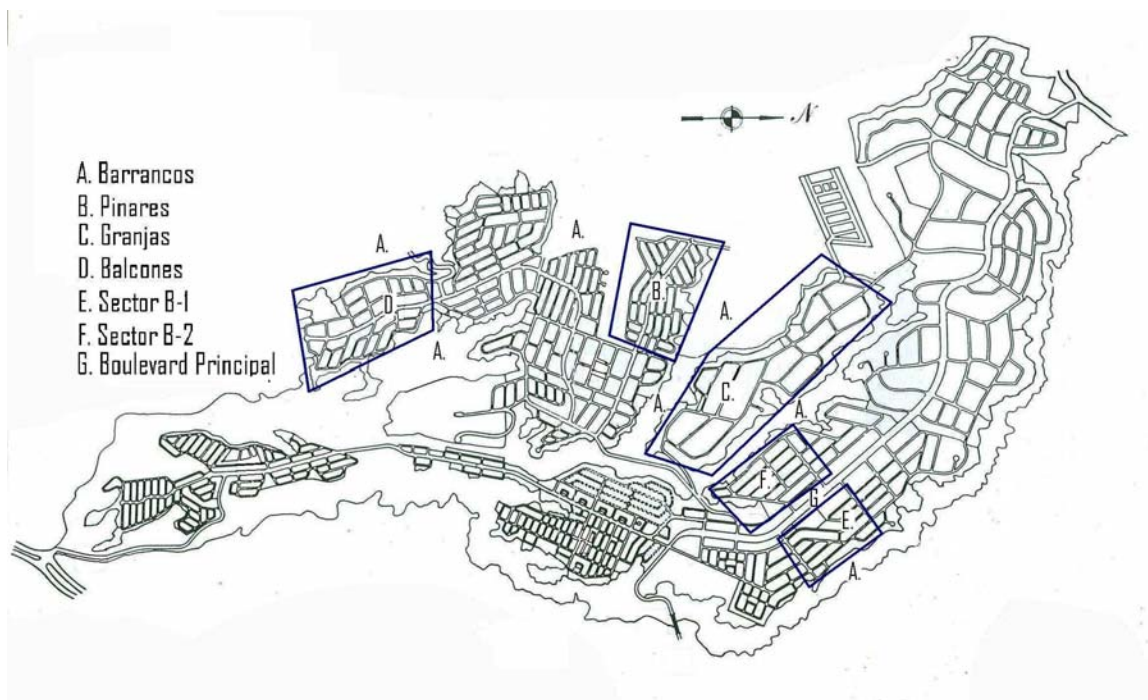


Figura 7. Mapa de Ciudad San Cristóbal, departamento de Guatemala, Municipio de Mixco, zona 8. Se señalan las distintas colonias en las que se encontraron sueros positivos a anticuerpos de *E. canis*, así como los barrancos que las separan o bulevares (Burbano, E.; Gerente de Ventas, Deinco de Ciudad San Cristóbal, febrero 2006 comunicación personal).

Cuadro 5. Distribución por procedencia de los individuos muestreados para la determinación de la presencia anticuerpos contra *E. canis*, a través de la prueba ELISA Snap.

Procedencia	Prueba de ELISA				Total	% procedencia
	Positivos	%	Negativos	%		
Granjas	2	3.508772	5	8.77193	7	12.28070175
Pinares	1	1.754386	8	14.03509	9	15.78947368
Balcones	1	1.754386	19	33.33333	20	35.0877193
Sector B-1	2	3.508772	11	19.29825	13	22.80701754
Sector B-2	1	1.754386	7	12.2807	8	14.03508772
Total	7	12.2807	50	87.7193	57	100

Todos los individuos muestreados presentaron problema de garrapatas. Y de los siete individuos que resultaron positivos a la prueba ELISA, cinco de ellos no presentaron síntoma alguno, uno presentó síntomas de moquillo canino y el otro presentó también síntomas de moquillo canino y debilidad muscular.

El moquillo canino presenta varios síntomas parecidos a los de la ehrlichiosis canina como debilidad, conjuntivitis, fiebre, vómitos, deshidratación, inflamación de linfáticos retrofaringeos, leucopenia, anorexia, pérdida de peso y algunas anomalías del sistema nervioso central (Ellgutter, E.; Médico Veterinario, Clínica Veterinaria Ixchel Ciudad San Cristóbal, 2006 comunicación personal).

Las pruebas ELISA Snap fueron adquiridas en paquetes de 30 dispositivos cada uno, haciendo un total de 90. Por lo que los cuatro dispositivos restantes se emplearon como control negativo corriéndolos a cuatro perros que nunca han estado infestados de garrapatas, obteniendo resultados negativos en todas.

IV. DISCUSIÓN

A. Identificación de garrapatas

Durante este estudio la única especie de garrapatas que se identificó parasitando los individuos muestreados, fue *R. sanguineus*. Con esto se logró comprobar que el vector de ehrlichiosis canina se encuentra parasitando a perros en el área que abarca Ciudad San Cristóbal.

B. Prueba de diagnóstico ELISA para *E. canis*

Este estudio se realizó con el objetivo principal de detectar la presencia de anticuerpos contra *E. canis* en Ciudad San Cristóbal, Guatemala. Para esto se realizaron 86 pruebas de ELISA a sueros caninos de individuos que presentaron infestación de garrapatas. Se obtuvieron solamente siete positivos, dando una prevalencia muy baja de 8.14%. Aunque esta no es significativa, se logró probar que existen anticuerpos contra la enfermedad en el área, es decir que hubieron ciertos perros que han estado en contacto con *E. canis*, comprobando así la presencia de la enfermedad en Guatemala. Comparando con los estudios realizados en otros países donde se han encontrado prevalencias desde 4% en Barcelona, hasta 93.3% en Mexicali, se podría deducir que la enfermedad no lleva mucho tiempo en el área de Ciudad San Cristóbal debido a que no se encuentra muy diseminada en la población de garrapatas, tomando en cuenta que todos los perros muestreados presentaron infestación del vector. Pero pudiera ser que en otras áreas del país la prevalencia sea mayor.

Se presentaron diferentes variables que podían o no incidir en la presentación de anticuerpos en los individuos, estas fueron: la edad, el sexo, la raza y la procedencia. Con respecto al sexo, se notó un menor número de hembras positivas a *E. canis* que de machos. Pero si se observa a nivel de la muestra completa se pudo notar que hubo mayor

cantidad de machos que de hembras (cuadro 2). Por lo que esto puede apoyar el que sean más machos positivos que hembras. Por último, para comprobar que el sexo no está asociado a la presencia de anticuerpos contra *E. canis*, se realizó una prueba chi cuadrado, así determinando que el sexo no influye en los resultados. Es decir, no importa si el individuo es macho o hembra tienen igual probabilidad de presentar anticuerpos contra *E. canis*.

No hubo relación entre la raza del individuo y la presencia de anticuerpos de *E. canis*, ya que se obtuvieron positivos de varias razas (cuadro 3). Es decir, todas las razas de perros infestadas con garrapatas tienen la misma posibilidad de entrar en contacto con la enfermedad y formar anticuerpos

Según estudios anteriores se cree que el Pastor Alemán es uno de las razas que presenta cuadros clínicos más graves, por que es más susceptible a la enfermedad. Con estos antecedentes, se esperaba que los individuos positivos de esta raza presentaran a la vez síntomas de la enfermedad. Entre los positivos se obtuvieron dos Pastores Alemanes, uno asintomático y el otro con síntomas compatibles con la enfermedad, aunque no se confirmó que el cuadro clínico fuera causado por *E. canis*, debido a que no se realizó ninguna prueba para detectar la presencia de la bacteria si no solamente de anticuerpos.

La ehrlichiosis canina se ha reconocido como una enfermedad de perros jóvenes (menores de 2 años), por lo que se esperaba que la mayor cantidad de individuos fueran en este rango, aun así la enfermedad puede presentarse a toda edad. Por el contrario la mayor cantidad de los individuos positivos obtenidos eran más que todo adultos (cuadro 4). Por lo tanto en este estudio la edad no tuvo alguna asociación con la presencia o ausencia de anticuerpos contra *E. canis*. La prueba determinó que en ésta investigación la edad no influyó en los resultados.

Como último factor se observó la procedencia de los individuos positivos (cuadro 5), debido a que estos estuvieron repartidos en una proporción similar en las cinco colonias, se comprobó que la procedencia en este estudio no afectó los resultados.

Aunque las colonias con los individuos positivos se encuentran separadas, en algunos casos por otras colonias, por barrancos o por bulevares, esto no influyó en la presencia del vector infectado. Esto puede deberse a que el vector puede ser trasladado de un lugar a otro por aves, perros callejeros, personas, traslado de perros (ej.: paseos, veterinarias), etc.

Ninguno de los factores influyó en la presencia de los anticuerpos contra *E. canis*. Esto pudo haber sido por la poca cantidad de resultados positivos, así como el tamaño de la muestra. Para tener datos más significativos se debe emplear una muestra de mayor tamaño.

Se pudo observar que cinco de los siete perros que resultaron positivos a anticuerpos contra *E. canis*, no presentaron síntoma alguno. Esto pudo haber sido debido a que los individuos estuvieron en contacto con el agente y no desarrollaron la enfermedad o la desarrollaron y se recuperaron satisfactoriamente. Según estudios anteriores se ha visto que algunos perros son capaces de resolver la enfermedad sin necesidad de tratamiento alguno. Así también, algunos perros en fase subclínica no presentan síntomas de la enfermedad y pueden mantenerse asintomáticos por largos períodos de tiempo, por lo que esto también puede ser una explicación a los resultados.

Por último se obtuvieron dos perros que resultaron positivos a anticuerpos de *E. canis* y se diagnosticaron clínicamente con moquillo canino. Esto pudo haber sido debido a que el moquillo canino y la ehrlichiosis canina presentan varios síntomas en común, por lo que pudieron haberse confundido las enfermedades. Es decir, como no se realizó ninguna prueba para confirmar el diagnóstico clínico, la enfermedad pudo tratarse de ehrlichiosis canina, pero como ésta no había sido diagnosticada en Guatemala, los síntomas se atribuyeron a moquillo canino. Así mismo, como con la prueba ELISA Snap no puede comprobarse la presencia de la enfermedad si no que únicamente la presencia de anticuerpos contra *E. canis*, no se pudo concluir cual de los dos agentes estaba produciendo los síntomas observados. Como información extra, estos dos individuos fueron tratados con tetraciclina, antibiótico eficiente contra *E. canis*. Los dos caninos se

recuperaron rápidamente de la enfermedad, lo que pudiera apoyar que se tratara de *E. canis* y no de moquillo canino.

Uno de los individuos que resultó positivo a anticuerpos contra *E. canis* y que presentó síntomas de moquillo canino, también presentó debilidad muscular. Esta también se puede acreditar a la ehrlichiosis canina, debido a que es uno de los síntomas que se ha observado en ésta. Aún así, como se mencionó anteriormente no puede comprobarse esto debido a que la prueba no dice si el individuo presenta o no la enfermedad.

La prueba empleada de ELISA es muy sencilla de realizar y rápida, y es eficiente ya que solamente resulta como positiva si detecta un grado significativo de anticuerpos contra *E. canis*. Los resultados de esta prueba no indican que los perros presenten la enfermedad ya que la prueba solamente detecta anticuerpos a esta bacteria, es decir si el perro ha estado o no en contacto con ella, no si aún la tiene.

Para poder obtener un diagnóstico confirmativo de la enfermedad se deben de combinar algunas de las técnicas mencionadas anteriormente. Es decir, primero realizar un ELISA o una prueba de inmunofluorescencia para anticuerpos y confirmar a los casos positivos mediante la visualización de la mórula en monocitos circulantes mediante un frotis sanguíneo, junto con un Western-blot o un PCR. Nunca olvidando si tuvo o no infestación por garrapatas y la sintomatología.

Hay que tomar en cuenta que muchos de los perros infestados con garrapatas, no son llevados al veterinario, si no que únicamente tratados con insecticidas o en algunos casos no tratados. Por lo que los resultados positivos podrían aumentar si se realizara un estudio más amplio con una investigación de casa en casa e incluyendo a los perros callejeros.

V. CONCLUSIONES

1. La garrapata café del perro, *R. sanguineus*, vector de la enfermedad ehrlichiosis canina, se encuentra en Ciudad San Cristóbal, Guatemala. Debido a que las garrapatas obtenidas de los perros muestreados se identificaron como tales.
2. La prevalencia de *E. canis* encontrada en este estudio (8.14%), no es significativa ya que es un porcentaje muy bajo, aunque comprueba la existencia de la enfermedad en el país.
3. La prevalencia demuestra que los perros de Ciudad San Cristóbal, en el departamento de Guatemala, poseen anticuerpos circulantes contra *E. canis*, debido al contacto con el vector de esta enfermedad.
4. El sexo de los individuos muestreados no se encuentra asociado a la presencia de anticuerpos contra *E. canis*.
5. En este estudio la raza no influyó en la presencia o ausencia de anticuerpos contra *E. canis* en los distintos individuos muestreados.
6. La edad en esta investigación, no se encontró asociada a la presencia de anticuerpos contra *E. canis* en los perros muestreados.
7. La procedencia del individuo muestreado no tuvo efecto sobre la positividad de la prueba a *E. canis*.
8. Cinco de los siete perros que presentaron anticuerpos contra *E. canis*, no presentaron síntoma alguno, probablemente a que ya no presentaban la enfermedad o que se encontraban en fase subclínica.

9. Dos de los perros que resultaron positivos a la prueba, presentaron síntomas de moquillo canino, debido a la similitud de ciertos de sus síntomas, es muy difícil realizar un diagnóstico clínico diferencial.
10. Uno de los individuos positivos a la presencia de los anticuerpos contra *E. canis* presentó además de los síntomas de moquillo canino, debilidad muscular que es un síntoma de la ehrlichiosis.
11. La prueba realizada solamente demuestra que los perros han estado en contacto con el agente etiológico y no que presentan la enfermedad, ya que la prueba sólo determina si los individuos presentan o no anticuerpos contra *E. canis*. Por lo que no se pudo comprobar la presencia de la enfermedad en alguno de los individuos muestreados.
12. Es importante considerar la Ehrlichiosis canina como alternativa diagnóstica en todos aquellos pacientes con síntomas compatibles con la enfermedad.

VI. RECOMENDACIONES

1. Este trabajo fue preliminar para próximos estudios más complejos y extensos. Al haberse comprobado la presencia de la enfermedad en un área específica de Guatemala, se puede realizar una investigación de mayor inversión de capital y de tiempo.
2. Para investigaciones siguientes se deben abarcar mayores áreas u otras en las cuales la prevalencia del vector es mayor, como en las áreas de las costas de Guatemala. Al realizar este tipo de estudio en un área mayor se tendrá un número superior de datos, para poder obtener resultados más certeros y estadísticamente significativos. Si se realiza el estudio en un área en que la presencia del vector es mayor, probablemente se tienen mayores probabilidades de obtener más animales positivos a la enfermedad. También debería considerarse el realizar este tipo de estudio en áreas rurales, en las cuales los perros no presentan los cuidados y beneficios que presentaron en este estudio, al tratarse la mayoría de perros con dueños de clase media y media-alta.
3. Sería conveniente hacer investigaciones empleando mayor cantidad de técnicas (historia clínica, sintomatología, pruebas histológicas, hematológicas, de orina, serológicas o genéticas). De esta forma se podría conocer más sobre la enfermedad y no solamente si han estado en contacto con ésta o no. Y con esto podrían compararse la eficiencia de los distintos métodos.
4. Se recomienda usar una mayor cantidad de individuos de muestreo, para poder obtener datos más precisos sobre la influencia de varios factores (edad, sexo, raza, etc.) sobre la positividad hacia la enfermedad.
5. Se podría considerar emplear las garrapatas que se encuentren infestando a los perros de muestra, para verificar si llevan la enfermedad o no. Esto podría

realizarse empleando, por ejemplo técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

VII. LITERATURA CITADA

1. BIBERSTEIN, E. L. y C. Y. ZEE. 1994. *Tratado de Microbiología Veterinaria*. Tomo 2. Departamento de microbiología. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. Pp. 425-430.
2. BIRCHARD, S. J. y K. G. SHERDING. 1996. *Manual clínico de pequeñas especies*. McGraw-Hill Interamericana. México, D. F. 1: 146-148.
3. BOCKINO, L. *et al.* 2003. *Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program*. En: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/bockino/index.php>, [con acceso el 18 de octubre del 2006].
4. CARTER, G. R. y M. M. CHENGAPPA. 1994. *Bacteriología y micología veterinarias*. 2ª ed. Manual Moderno. México, D. F. Pp.421-422.
5. CDC. 2000. *Human Ehrlichiosis in the United States*. Center for Disease Control and Prevention. En: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/ehrlichia/Organisms/Organism.htm>, [con acceso el 18 de octubre del 2006].
6. CODNER, E. y L. FARRIS-SMITH. 1986. *Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189(1):47-50. En: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=3733499&query_hl=1&itool=pubmed_docsum, [con acceso el 16 de febrero del 2006].
7. COLES, E. H. 1968. *Patología y diagnóstico veterinarios*. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F. Pp. 94.
8. DRUGUERI, L. 2004. *Garrapata parda del perro: Rhipicephalus sanguineus*. En: <http://www.zoetecocampo.com/Documentos/perro.htm>, [con acceso el 9 de febrero de 2006].

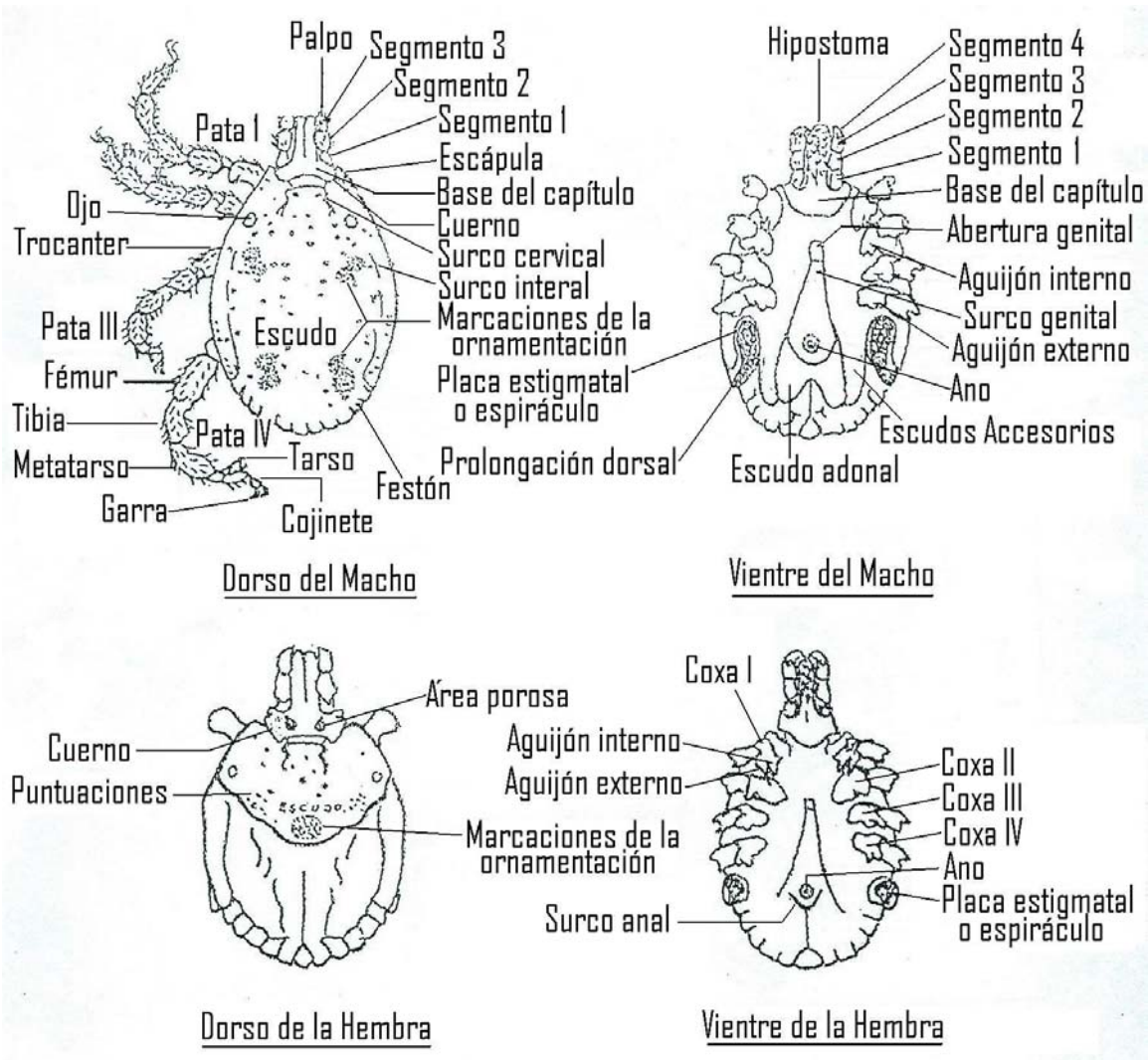
9. ELLGUTTER, E. 2006. Médico Veterinario. *Archivo Clínica Veterinaria Ixchel*. Ciudad San Cristóbal, Guatemala.
10. GOBIERNO VASCO. 1997. *Revisión bibliográfica*. En: <http://personal.redestb.es/rajuste/epha03.htm>, [con acceso el 9 de febrero del 2006].
11. HARRUS, S. 1999. *Canine Monocytic Ehrlichiosis: Patogenesis to clinical manifestations*. En: <http://www.ivis.org/advances/>, [con acceso el 9 de febrero del 2006].
12. IDEXX Laboratories, 2002. *Canine Heartworm Antigen/ Borrelia Burgdorferi/ Ehrlichia canis Antibody Test Kit*. USA.
13. IICA/MAGA. 1988. *Proyecto Nacional de control de garrapatas*. Cooperación Técnica de Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala. Pp. 15.
14. JUBB, K. V. F. y P. C. KENNEDY. 1970. *Pathology of domestic animals*. 2a ed. Academic Press. Vol 1. Nueva York y London. Pp. 677-678.
15. LÓPEZ, J. *et al.* 1999. *Hallazgo de Ehrlichia canis en Chile, informe preliminar*. Arch. Med. 31(2):1-2. En: <http://www.mismascotas.cl/perro/ehrlichia.htm>, [con acceso el 16 de febrero].
16. MERCHANT, I.A. y R. A. PACKER. 1980. *Bacteriología y virología veterinarias*. 3ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza. Pp. 523.
17. NIEMAND, H. G., 1984. *Prácticas de clínica canina*. 3ª ed. Editorial Continental, S.A. México. Pp. 51.
18. PRODESA/MAGA. 1988. *Resultado del estudio ecológico de garrapatas en Guatemala*. División de Ectoparásitos. Programa de sanidad animal/Ministerio de agricultura, ganadería y alimentación. Guatemala. Pp. 40.
19. REY, J. *et al.* 2002. *Ehrlichia en Florida*. En: <http://edis.ifas.ufl.edu/IN422>, [con acceso el 9 de febrero del 2006].

20. RICHARDS, M. 2001. *Blood borne parasitic problems in dogs*. En: <http://www.vetinfo.com/derlick.html#ehrlichia>, [con acceso el 9 de febrero del 2006].
21. ROMANO, O. M. *et al.* 1998. *Demostración de Ehrlichia canis mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, Baja California*. Rev. AMMVEPE. 9(3):86.
22. ROURA, X. *et al.* 2005. *Serological evidence of exposure to Rickettsia, Bartonella, and Ehrlichia species in healthy or Leishmania infantum-infected dogs from Barcelona, Spain*. Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. 3(2): 129-137.
23. RUNNELLS, E. A. *et al.* 1982. *Principios de Patología Veterinaria: Anatomía Patológica*. 7ª ed. Editorial Continental, S. A. México, D. F. Pp. 448-449.
24. SAINZ, A. *et al.* 2000. *La Ehrlichiosis en el perro: Presente y futuro*. En: http://www.colvet.es/madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm, [con acceso el 9 de febrero del 2006].
25. SEAMAN, R. *et al.* 2004. *Comparison of results for serologic testing and a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. 65(9):1200–1203. En: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2004.65.1200>, [con acceso el 16 de febrero del 2006].
26. SIMÓN, C. 2005. *Ehrlichiosis*. En: <http://www.mevepa.cl/modules.php?name=News&file=article&sid=590>, [con acceso el 9 de febrero del 2006].
27. TODAR, K. 2005. *The Rickettsiae*. En: <http://textbookofbacteriology.net/Rickettsia.html> [con acceso el 14 de agosto 2006].
28. TSACHEV, I. y V. KONTOS. 2004. *Ehrlichia canis infections – Results of sero-epidemiological study in dogs in Bulgaria*. En: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&PID=8984&Category=1288&O=Generic>, [con acceso el 16 de febrero del 2006].

29. VIGNARD-ROSEZ, K. *et al.* 1999. *Ehrlichiosis canina*. Laboratorios CEPAV. En:
http://www.cepav.com.br/textos/t_erliq.htm, [con acceso el 9 de febrero del 2006].
30. WANER, T. y S. HARRUS. 2000. *Canine Monocytic Ehrlichiosis*. En:
<http://www.ivis.org/>, [con acceso el 9 de febrero del 2006].

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. PARTES DE UNA GARRAPATA *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS*.



(Depto. Parasitología, FMVZ, USAC 2006).

ANEXO 2. GLOSARIO

- Anamnesis:** Conjunto de síntomas que han existido con anterioridad al período en que se examina al enfermo.
- Anemia:** Privación de sangre o, mejor todavía, insuficiencia hemática. Se manifiesta por la disminución aparente o real del número de hematíes (glóbulos rojos) y el descenso de la cifra de hemoglobina.
- Anticolinesterasa:** Son compuestos muy tóxicos que producen inactivación irreversible de las colinesterasas. Las cuales tienen como función hidrolizar la acetilcolina la cual en exceso causa síntomas nerviosos.
- Aplasia:** Disminución, atrofia de una parte constitutiva de un órgano.
- Autoinmune:** Producción de anticuerpos contra las células del propio organismo.
- Bicitopenia:** Disminución de dos tipos de células sanguíneas.
- Conjuntivitis:** Inflamación de la conjuntiva debida a agentes patógenos diferentes.
- Disnea:** Dificultad de respirar.
- Edema:** Infiltración del tejido celular subcutáneo y del tejido celular esplácnico (relación con vísceras) por la serosidad.
- Epistaxis:** Hemorragia de la mucosa nasal: salida de sangre por la nariz.
- Equimosis:** Extravasación sanguínea fuera de los capilares con infiltración en el tejido celular.
- Esplenectomía:** Extracción del bazo.
- Esplenomegalia:** Hipertrofia (agrandamiento) considerable del bazo.
- Glomerulonefritis:** Inflamación aguda de los glomérulos del riñón.
- Glucocorticoides:** Hormonas secretadas por la corteza suprarrenal.
- Hematuria:** Emisión de orina mezclada con sangre.
- Hematopoyéticos:** Estimulantes de producción de glóbulos rojos.
- Hepatomegalia:** Hipertrofia (agrandamiento) del hígado.
- Hepatosplenomegalia:** Hipertrofia del hígado y del bazo.

Hiperglobulinemia: Aumento de la globulina sanguínea.

Hiperplasia: Proliferación de un tejido, de un órgano o de una parte de un órgano, como consecuencia del aumento de los elementos que constituyen este tejido o este órgano. Provocando un aumento del funcionamiento de este.

Hiperproteinemia: Disminución acentuada del nivel de proteína sanguínea.

Hipertermia: Estado del organismo caracterizado por una sobreelevación del calor físico normal. Fiebre.

Hipoalbuminemia: Disminución de la albúmina sanguínea.

Hipoglobulia: Disminución del número normal de glóbulos rojos en la sangre (hematíes). Es uno de los caracteres de la anemia.

Hipoplasia: Disminución de la textura d un órgano, de la composición histológica de un tejido. Provocando una disminución de su funcionamiento.

Inmunomediados: Procesos realizados a través del sistema inmune.

Insuficiencia Renal: Mal funcionamiento del proceso de filtración de la sangre por medio de los riñones.

Leucopenia: Disminución del número de glóbulos blancos.

Linfadenopatía: Infección localizada en el sistema linfático.

Linfocitosis: Número de linfocitos por campo de microscopio; la linfocitosis se hace patológica cuando los linfocitos pasan de 6 a 8 por campo de microscopio.

Meningitis: Inflamación de las meninges.

Meningoencefalitis: Inflamación de las meninges y del tejido cerebral.

Monocitopenia: Disminución de un tipo de células sanguíneas.

Neumonitis: Inflamación del pulmón.

Pancitopenia: Disminución de todas las células sanguíneas.

Petequias: Mancha roja viva puntiforme debida a una hemorragia puntiforme intradérmica.

Pioderma: Infección purulenta de la piel.

Pirexia: Estado del organismo caracterizado por una sobreelevación del calor físico normal. Fiebre.

Plasmocitosis: Presencia de células inflamatorias.

Poliartritis: Inflamación que se localiza en varias articulaciones a la vez.

Polimiositis: Enfermedad inflamatoria de carácter infeccioso que afecta varios músculos simultáneamente.

Proteinuria: Eliminación de proteínas por la orina.

Septicemia: Infección general del organismo con circulación de gérmenes patógenos en la sangre.

Sialorrea: Derrame abundante de saliva fuera de la boca.

Trombocitopatías: Enfermedad donde el número de trombocitos normal en la sangre se encuentra alterado.

Trombocitopenia: Disminución del número de trombocitos en la sangre.

Uveítis: Inflamación de la membrana del ojo: la úvea.

Vasculitis: Inflamación de uno o varios vasos sanguíneos.

ANEXO 3. HOJA DE REGISTRO DE LOS PERROS MUESTREADOS

Fecha de Muestreo	Muestra	Resultado	Raza	Sexo	Edad (años)	Procedencia	Sin síntomas
19/06/06	83	Negativo	cocker	M	3	valle dorado	Sí
19/06/06	82	Negativo	pastor alemán	M	10	valle dorado	Sí
19/06/06	81	Negativo	schnauzer min.	M	9	pinares	Sí
19/06/06	80	Negativo	silkie terrier	M	10	pinares	Sí
19/06/06	79	Negativo	collie	M	12	sector B-3	Sí
21/06/06	50	Negativo	cruce	M	0.11	granjas	No
21/06/07	51	Negativo	cocker	M	8	balcones 2	Sí
21/06/08	52	Negativo	cruce	M	10	sector A-9	Sí
21/06/09	53	Negativo	french poodle	M	5	sector A-1	Sí
21/06/10	54	Negativo	cocker	H	7	sector A-1	Sí
21/06/11	55	Negativo	boxer	H	3	balcones	Sí
21/06/12	56	Negativo	french poodle	M	4	sector B-1	Sí
21/06/13	57	Negativo	rottweiler	H	6	sector B-1	Sí
21/06/14	58	Negativo	labrador	H	2	sector B-1	Sí
21/06/15	59	Negativo	dackel	M	6	balcones	No
21/06/16	60	Negativo	cruce	H	6	balcones	Sí
21/06/17	61	Negativo	basset	M	3	pinares	Sí
21/06/18	62	Negativo	cocker	H	5	balcones	Sí
21/06/19	63	Negativo	pastor alemán	H	9	sector B-3	Sí
21/06/20	64	Negativo	cocker	H	10	balcones	Sí
21/06/21	65	Negativo	cocker	M	5	sector B-1	Sí
21/06/22	66	Negativo	cocker	H	5	sector B-1	Sí
21/06/23	67	Negativo	bull dog	H	2	sector A-1	Sí
21/06/24	68	Negativo	shitzu	M	9	valle dorado	Sí
21/06/25	69	Negativo	french poodle	M	3	valle dorado	Sí
21/06/26	70	Negativo	schnauzer	H	9	valle dorado	Sí
21/06/27	71	Negativo	sharpei	H	0.5	san crist. II	Sí
21/06/28	72	Negativo	french poodle	H	6	sector B-3	Sí
21/06/29	73	Negativo	french poodle	M	6	sector B-3	Sí
21/06/29	84	Negativo	chow chow	H	5	sector A-1	Sí
22/06/06	85	Negativo	pastor alemán	H	0.9	granjas	Sí

Continuación Anexo 3

27/06/06	86	Negativo	beagle	M	3	balcones	No
5/7/2006	1	Negativo	schnauzer min.	M	1	pinars	Sí
5/7/2006	2	Negativo	golden retriever	H	1.5	sector B-1	No
5/7/2006	3	Negativo	chow chow	M		san crist. II	Sí
5/7/2006	4	Negativo	rottweiler	H	0.11	sector B-4	Sí
5/7/2006	5	Negativo	schnauzer min.	H	10	sector B-2	Sí
5/7/2006	6	Negativo	french poodle	M	5	san crist. II	Sí
5/7/2006	7	Negativo	pastor alemán	M	8	sector B-1	Sí
5/7/2006	8	Negativo	boxer	H	0.11	sector B-4	Sí
5/7/2006	9	Positivo	french poodle	M	12	pinars	Sí
5/7/2006	10	Negativo	alaskan malamute	M	8		Sí
5/7/2006	11	Negativo	golden retriever	M	8		Sí
5/7/2006	12	Positivo	cocker	M	12	sector B-2	Sí
5/7/2006	13	Negativo	doberman	M	12	balcones	Sí
5/7/2006	14	Negativo	viejo pastor ingles	M	5	balcones	Sí
5/7/2006	15	Negativo	schnauzer min.	M	1.5	sector C-1	No
5/7/2006	16	Negativo	boxer	M	12	sector B-2	Sí
5/7/2006	17	Positivo	french poodle	H	1.5	balcones	Sí
5/7/2006	18	Negativo	golden retriever	M	10	balcones	Sí
5/7/2006	19	Negativo	cocker	M	12	sector B-2	Sí
5/7/2006	20	Negativo	french poodle	M	4	pinars	Sí
5/7/2006	21	Negativo	pastor alemán	M	10	vista al valle	Sí
5/7/2006	22	Negativo	cruce	H	7	balcones	Sí
5/7/2006	23	Negativo	beagle	H	2	sector A-3	Sí
5/7/2006	24	Negativo	pastor alemán	H	7	sector B-1	Sí
5/7/2006	25	Negativo	labrador	M	3	boulevard sur	Sí
5/7/2006	26	Negativo	french poodle	H	5	balcones	Sí
5/7/2006	27	Negativo	cruce	H	6	balcones	Sí
5/7/2006	28	Negativo	french poodle	M	9	balcones	Sí
5/7/2006	29	Negativo	doberman	H	9	panorama	Sí

Continuación Anexo 3

12/7/2006	30	Negativo	collie	H	12	sector A-10	Sí
12/7/2006	31	Negativo	cruce	M	14	vista al valle	Sí
12/7/2006	32	Positivo	pastor belga	M	6	sector B-1	Sí
12/7/2006	33	Negativo	collie	H	4	valle de sn. crist.	Sí
12/7/2006	34	Negativo	french poodle	M	11	pinares	Sí
12/7/2006	35	Negativo	labrador	H	10	balcones	Sí
12/7/2006	36	Negativo	schnauzer min.	H	0.8	sector B-1	Sí
12/7/2006	37	Negativo	cocker	M	9	balcones	No
12/7/2006	38	Negativo	french poodle	H	3	pinares	Sí
12/7/2006	39	negativo	bull dog	M	5	sector B-2	Sí
12/7/2006	40	negativo	french poodle	H	1.5	sector A-10	Sí
12/7/2006	41	negativo	cocker	H	7		Sí
12/7/2006	42	negativo	beagle	M	3	sector A-9	Sí
12/7/2006	43	negativo	viejo pastor inglés	H	6	valle dorado	Sí
12/7/2006	44	negativo	schnauzer min.	H	3	sector B-3	Sí
12/7/2006	45	negativo	sharpei	M	5	balcones	Sí
12/7/2006	46	negativo	akita	H	2	balcones	Sí
12/7/2006	47	positivo	labrador	M	9	granjas	No
12/7/2006	48	negativo	cocker	M	0.8	sector A-10	No
12/7/2006	49	negativo	french poodle	M	10	granjas	Sí
12/7/2006	74	positivo	pastor alemán	M	8	sector B-1	Sí
12/7/2006	75	negativo	boxer	M	8	sector B-2	Sí
12/7/2006	76	negativo	boxer	H	10	balcones	Sí
12/7/2006	77	negativo	french poodle	H	8	sector B-2	Sí
12/7/2006	78	positivo	pastor alemán	H	10	granjas	No

Continuación Anexo 3

No	Sí
No	Sí
No	Serio problema de garrapatas
No	Sí
No	Sí
No	Sí
No	Sí
Inflamación de linfáticos, esplenomegalia	Sí
No	Sí
No	Sí
No	Serio problema de garrapatas
No	Sí
No	Sí
No	Sí
No	Sí
No	Sí
Síntomas de moquillo canino, problemas musculares	Sí
Síntomas de moquillo canino	Sí
No	Sí
No	Problemas de garrapatas intermitente
No	Sí
No	Sí
No	Sí
Síntomas de moquillo canino	Problemas de garrapatas intermitente