

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE “MEDICINA VETERINARIA”**



**“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS
CIRCULANTES CONTRA *Ehrlichia canis* EN PERROS CON
HISTORIA DE GARRAPATOSIS ATENDIDOS EN UNA CLÍNICA
VETERINARIA DEL MUNICIPIO DE FRAIJANES, GUATEMALA,
EN EL PERÍODO COMPRENDIDO ENTRE DICIEMBRE 2011 –
FEBRERO 2012”**

DIEGO BOBADILLA MORALES

MÉDICO VETERINARIO

GUATEMALA, MAYO DE 2013

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE “MEDICINA VETERINARIA”**



**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS
CIRCULANTES CONTRA *Ehrlichia canis* EN PERROS CON HISTORIA
DE GARRAPATOSIS ATENDIDOS EN UNA CLÍNICA VETERINARIA DEL
MUNICIPIO DE FRAIJANES, GUATEMALA, EN EL PERÍODO
COMPRENDIDO ENTRE DICIEMBRE 2011 – FEBRERO 2012”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

DIEGO BOBADILLA MORALES

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA MAYO, DE 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO:	MSc.Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIO:	M. V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M. V. MSc Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M. V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Mercedes de los Ángeles Marroquín Godoy
VOCAL V:	Br. Jean Paul Rivera Bustamante

ASESORES

M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
M.V. Manuel Eduardo Rodríguez Zea
M.V. Jaime Rolando Méndez Sosa

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA *Ehrlichia canis* EN PERROS CON HISTORIA DE GARRAPATOSIS ATENDIDOS EN UNA CLÍNICA VETERINARIA DEL MUNICIPIO DE FRAIJANES, GUATEMALA, EN EL PERÍODO COMPRENDIDO ENTRE DICIEMBRE 2011 – FEBRERO 2012”

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

DEDICATORIAS

- A DIOS:** Por darme vida, salud, sabiduría y misericordia para poder cumplir mis metas.
- A MIS PADRES:** Claudio y Marta por su amor, sacrificio y apoyo incondicional que me han brindado en cada etapa de mi vida. Tomaré como ejemplo de vida sus enseñanzas. Los amo con todo mi corazón.
- A MI ESPOSA:** María Renee por tu amor, apoyo incondicional durante mi carrera, y por ser mi fuente de inspiración. Te amo mi bebe.
- A MIS HERMANOS:** Gabriel (Q.E.P.D.), Alejandra y Claudio, con ustedes comparto este título.
- A MIS SUEGROS:** René y Maritza por su gran apoyo y amor, ya que son parte importante en mi vida.
- A MIS TIOS:** Rosita (Q.E.P.D.), German (Q.E.P.D.) Rolando (Q.E.P.D.), Danilo (Q.E.P.D.), Chiqui, Gladys, Vinicio, Marcelo, Julito y Pilo.
- A MI FAMILIA:** Mis abuelos (Q.E.P.D.), primos y sobrinos.
- A MIS AMIGOS:** Gracias por su todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS:** Por darme su amor, misericordia y sabiduría.
- A MIS PADRES:** Por haberme guiado por un buen camino, por sus consejos y su amor.
- A MI ESPOSA:** Por ser mi ayuda idónea, mi amiga y mi mejor compañera.
- A MIS ASESORES:** Por su paciencia y apoyo.
- A MIS MAESTROS:** Por su paciencia y enseñanza en mi carrera.
- A MIS PADRINOS:** Por ser un ejemplo a seguir.
- A TODAS LAS PERSONAS:** No mencionadas y que compartieron momentos especiales durante mi carrera.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	3
III.	OBJETIVOS	4
	3.1 General	4
	3.2 Específicos	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
	4.1 Ehrlichiosis monocítica canina (EMC)	5
	4.1.1 Agente etiológico	5
	4.1.2 Sinónimos	6
	4.1.3 Transmisión	6
	4.1.4 Distribución	7
	4.1.5 Patogenia	7
	4.1.6 Signos Clínicos	9
	4.1.6.1 Fases de la enfermedad	9
	4.1.7 Hallazgos de Laboratorio	11
	4.1.8 Diagnóstico	12
	4.1.9 Tratamiento	14
	4.1.10 Profilaxis	16
	4.2 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16
	4.2.1 Huéspedes	16
	4.2.2 Localización en el huésped	17
	4.2.3 Ciclo biológico	17
	4.2.4 Control	18
	4.3 Respuesta Inmune.....	19
	4.3.1 Inmunoglobulinas.....	19
	4.3.1.1 Inmunoglobulina G.....	20

	4.3.1.2 Inmunoglobulina M.....	20
	4.3.1.3 Inmunoglobulina A.....	21
	4.3.1.4 Inmunoglobulina E.....	21
4.4	Prueba de ELISA	22
	4.4.1 Detección de antígenos.....	23
	4.4.2 Detección de anticuerpos.....	23
	4.4.3 Fundamento de la prueba	24
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1	Descripción del área de estudio	25
5.2	Recursos Humanos	25
5.3	Material Biológico	26
5.4	Materiales y equipo	26
	5.4.1 Recursos de laboratorio.....	26
	5.4.1.1 Equipo eléctrico.....	26
	5.4.1.2 Materiales y equipo de laboratorio.....	26
	5.4.1.3 Soluciones.....	26
	5.4.1.4 Otros recursos.....	27
	5.4.2 Centros de referencia.....	27
5.5	Metodología.....	27
	5.2.1 Localización del estudio	27
	5.2.2 Metodología de campo	27
	5.2.3 Interpretación del resultado de la prueba	29
	5.2.3.1 Resultados positivos	29
	5.2.3.2 Resultados negativos	29
	5.2.3.3 Resultados inválidos	29
5.6	Método estadístico	30
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1	Resultados	31
6.2	Discusión.....	38
VII.	CONCLUSIONES.....	40

VIII.	RECOMENDACIONES.....	41
IX.	RESUMEN.....	42
	SUMMARY.....	43
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	44
XI.	ANEXOS.....	48
	11.1 Encuestas para muestreo	49
	11.2 Diagrama de resultados de kit 4DX canine IDEXX	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1	31
Tabla No. 2	32
Tabla No. 3	34
Tabla No. 4	35
Tabla No. 5	36
Tabla No. 6	37

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica No. 1	31
Gráfica No. 2	33
Gráfica No. 3	34
Gráfica No. 4	35
Gráfica No. 5	36
Gráfica No. 6	37

I. INTRODUCCIÓN

La Ehrliquiosis Monocítica Canina es una enfermedad causada por una Rickettsia, *Ehrlichia canis*, la cual es transmitida por la garrapata del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) y parasita el citoplasma de los monocitos circulantes en la sangre del huésped. Se considera que la Ehrliquiosis Monocítica Canina tiene importancia en salud pública, debido a la posibilidad de ser una entidad zoonótica.

La distribución de la enfermedad está relacionada con la presencia de la garrapata, la cual transmite la infección 155 días después de infectarse; debido a lo mencionado anteriormente, la diseminación de la enfermedad en áreas con sobrepoblación canina y con sobreinfestación de garrapatas, ocurre de manera acelerada.

Las enfermedades causadas por Rickettsias no son detectadas fácilmente en mascotas, ya que son, en muchos de los casos, asintomáticos o se confunden con otras entidades.

Seleccioné el municipio de Fraijanes ya que, por ser un área suburbana, es frecuente la presencia de garrapatoxis canina. Es por ello que se decidió utilizar una clínica veterinaria que tiene afluencia de perros con garrapatoxis, se determinó con base en los expedientes médicos de la veterinaria que en promedio mensual llegan 30 casos, tomando en cuenta que llegan pacientes de varios puntos del municipio.

En Guatemala no existen reportes o estudios publicados de Ehrliquiosis en perros, por lo que en el presente estudio evalué *in vivo* la presencia de anticuerpos contra antígenos de Ehrlichiosis Monocítica Canina en perros con historia de garrapatoxis en Fraijanes Guatemala, utilizando el kit comercial canine

4DX de laboratorio IDEXX, el cual se basa en una prueba serológica ELISA indirecta. Dicha prueba requiere de un equipo mínimo y permite diagnóstico clínico rápido.

II. HIPÓTESIS

Existe presencia de anticuerpos circulantes contra *Ehrlichia canis* en perros con historia de garrapatoxis atendidos en una clínica veterinaria del municipio de Fraijanes, Guatemala, Guatemala.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Generar información sobre la presencia de reactores positivos a Ehrliquiosis Monocítica Canina en perros con historia de garrapatosis atendidos en una clínica veterinaria del municipio de Fraijanes, Guatemala.

3.2 Objetivo Específico:

Determinar la existencia de anticuerpos circulantes contra *Ehrlichia canis* en perros con historia de garrapatosis atendidos en una clínica veterinaria del municipio de Fraijanes, Guatemala.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 La Ehrlichiosis monocítica canina (EMC)

La Ehrlichiosis monocítica canina es causada por la Rickettsia *Ehrlichia canis*, la cual es transmitida por garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, microorganismos intracelulares que infectan leucocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos) y se multiplican dentro de una vacuola recubierta por membrana en la célula infectada. Esta enfermedad es reconocida como una enfermedad infecciosa importante y potencialmente fatal de los perros y otros miembros de la familia Canidae. (Baneth 2006, Kirk *et al* 1999)

La Ehrlichiosis tiene gran importancia en salud pública humana por ser una entidad zoonótica, en 1990 se observó que los monocitos humanos son susceptibles de infección por *E. canis*, por lo que se considero posible la infección de personas por dicha entidad, éste se ha aislado de una persona sana en un veterinario en Venezuela en el año de 1996 comprobándose genéticamente la identidad de esta Ehrlichia. (Pérez *et al*, 1996, McQuiston, *et al*. 2003, Ristic *et al*, 1990)

4.1.1 Agente etiológico

Las Rickettsias *Ehrlichia canis*, son bacterias intracelulares obligadas, gramnegativas, cocoides pleomórficas pequeñas (0,5 µm de diámetro), son aeróbicas y no tienen vía glucolítica. Son transmitidas por garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y parasitan el citoplasma, principalmente de los monocitos circulantes, en grupos de organismos denominados mórulas, por lo que las mórulas de *Ehrlichia canis*, que se encuentran en los monocitos y los macrófagos, son “microcolonias” de bacterias rodeadas por una vacuola con membrana. Las mórulas contienen 100 o más cuerpos de *Ehrlichia canis*. (Baneth 2006, Waner *et al* 2000)

4.1.2 Sinónimos

La Ehrlichiosis canina también es conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi y pancitopenia tropical canina. (Birchard *et al.* 2002)

4.1.3 Transmisión

La enfermedad es transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*, ésta ingresa los patógenos en su organismo al alimentarse de un hospedador infectado, éstos llegan al epitelio intestinal y penetran en la cavidad corporal de la garrapata (el hemocele) acompañados del agua y de los iones en exceso que son aprovechados por las glándulas salivares para formar la saliva que será de nuevo inoculada, en ese o en otro hospedador, permitiendo la transmisión de los agentes infecciosos ingeridos con la comida. La longevidad de las garrapatas, su potencial reproductivo y la posible transmisión transovárica de algunos patógenos hace que las garrapatas no sólo puedan actuar como vectores de enfermedades, sino también como reservorios de patógenos. (Cupp, 1991, Merck 2008, Sauer *et al*, 1986, Tatchell, 1967)

Se infectan de *E. canis* como larvas o ninfas al alimentarse de perros con rickettsias y transmiten la infección a perros susceptibles durante por lo menos 155 días después de la infección. Esto permite, al patógeno, sobrevivir al invierno en la garrapata e infectar a perros susceptibles. La mayoría de los casos se producen en las estaciones cálidas donde aumenta el número de garrapatas.

Como la transmisión de *E. canis* es mecánica y no biológica, las transfusiones de sangre infectada pueden también transmitir la rickettsia. (Kidd 2003, Merck 2008, Waner *et al* 2000)

El microorganismo se introduce en la célula por endocitosis mediada por un receptor o por fagocitosis, se multiplica por fisión binaria pasando a “cuerpos iniciales” y posteriormente a “mórulas”. Las mórulas se disgregan en cuerpos elementales una vez que la célula infectada se rompe, luego invaden nuevas células hasta provocar la parasitemia. (Kujman, *et al.* 2005)

4.1.4 Distribución

La distribución de la Ehrlichiosis está relacionada con la distribución del vector *Rhipicephalus sanguineus* y se ha descrito su ocurrencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América. (Baneth 2006; Waner *et al* 2000)

4.1.5 Patogenia

La patogenia de la enfermedad incluye un período de incubación de 8 – 20 días, seguido de 3 fases consecutivas: una fase aguda, fase subclínica y fase crónica. No todos los perros infectados desarrollan la fase crónica y las condiciones que conducen dicha formas no son conocidas. (Birchard *et al.* 2002, Baneth 2006)

Una gran variedad de factores como el tamaño de inóculo, cepa de *Ehrlichia*, inmunidad del paciente, enfermedades concomitantes producidas por otros parásitos transmitidos por garrapatas, pueden influir en el curso y el resultado de la infección. No hay predilección de edad y sexo en esta enfermedad; sin embargo, parece que los Pastores Alemanes son más susceptibles, ya que desarrollan la fase crónica con más frecuencia, posiblemente a una respuesta disminuida de inmunidad celular. (Birchard *et al.* 2002, Waner *et al* 2000)

En la garrapata, la *E. canis*, se disemina desde el intestino a las glándulas salivares a través de las células sanguíneas. Al alimentarse, las garrapatas inyectan en el lugar, las secreciones de las glándulas salivares contaminadas con

E. canis. Los tres estados de la garrapata (larva, ninfa y adulto), son capaces de transmitir la enfermedad. Se ha demostrado que las garrapatas pueden sobrevivir como adultos 155 a 568 días sin alimentarse y transmitir la infección por 155 días después de infectarse. Este fenómeno permite a las garrapatas sobrevivir durante el invierno e infectar a los huéspedes en la época seca siguiente. Las garrapatas son más abundantes durante las estaciones cálidas y la mayoría de los casos agudos de Ehrlichiosis ocurren durante esos períodos. (Baneth 2006; Waner *et al* 2000)

La patogénesis de la Ehrlichiosis canina incluye un período de incubación de 8 a 20 días, seguido de una fase aguda, subclínica y otra crónica. Durante la fase aguda, el parásito ingresa al torrente sanguíneo y linfático, se localiza en los macrófagos del sistema retículo-endotelial del bazo, hígado y ganglios linfáticos, donde se replica por fisión binaria. Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan a las rickettsias hacia otros órganos del cuerpo. La fase aguda puede durar entre 2 y 4 semanas. Los perros mal tratados, o no tratados, pueden desarrollar posteriormente una fase subclínica que aunque sin signos clínicos de la enfermedad mantienen recuentos bajos de plaquetas. Estos pacientes se transforman en portadores sanos por un período que puede llegar hasta los 3 años. Durante el curso de la enfermedad, ocurren recombinaciones repetidas en los genes antigénicos proteicos principales de la membrana externa de ehrlichias, que conduce a la generación de variaciones en epítopes inmunogénicos y permite que los microorganismos evadan los mecanismos de defensa del huésped y den como resultado infecciones persistentes. En los pacientes con fase crónica de la enfermedad, en su forma más grave, el cuadro se caracteriza por la reducción de la producción de elementos sanguíneos de la médula ósea. (Merck 2008, Waner *et al*. 2000)

Diferentes mecanismos inmunológicos intervienen en la patogénesis de la enfermedad, entre los día 4 y 7 posteriores a la infección aparece IgM e IgA y la

IgG aumenta a partir del día 15, esta respuesta humoral tiene un efecto mínimo en la eliminación del organismo intracelular y no proporciona protección ante una nueva infección, en cambio produce efectos perjudiciales en el progreso de la enfermedad debido a las consecuencias inmunopatológicas. Esto se evidencia por pruebas de Coombs y de autoaglutinación positivas en animales infectados y la demostración de anticuerpos antiplaquetas (APA), lo cual parece ser una de las causas de la trombocitopenia o trombocitopatía. (Waner *et al.* 2000)

4.1.6 Signos Clínicos

Se han descrito una gran variación de signos clínicos y esto puede ser debido a muchos factores, incluyendo diferencias en la patogenicidad entre las cepas de *Ehrlichia*, raza de perros, infecciones concomitantes con otras enfermedades transmitidas por garrapatas y el estado inmunitario del perro. (Birchard *et al.* 2002, Merck 2008)

4.1.6.1 Fases de la enfermedad

- Fase Aguda: ocurre una a tres semanas después de la infección y los signos clínicos solo duran dos a cuatro semanas; las manifestaciones más comunes en esta fase son depresión, anorexia, letargo, pérdida de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia y fiebre. Los perros pueden presentar tendencia al sangrado, petequias y esquimosis en la piel y membranas mucosas, y ocasionalmente epistaxis. Los signos oculares son frecuentes e incluyen uveítis, hipema, tortuosidad de vasos retinales y lesiones corio-retinales focales. Puede haber desprendimiento de retina y ceguera debido a hemorragias subretinales. Se pueden presentar otros signos clínicos como vómitos, descarga oculonasal serosa a purulenta, claudicación, ataxia y disnea. (Baneth 2006; Kirk *et al.* 1999)

- Fase Subaguda: puede durar años, pero generalmente es subclínica, por lo que no se sabe mucho sobre ella o sobre los factores que transforman infecciones subclínicas en un estado crónico. (Baneth 2006; Kirk *et al* 1999; Waneret *al* 2000)
- Fase Crónica: es la etapa final de la enfermedad que puede acompañarse de manifestaciones leves a graves; en estos casos se pueden observar signos clínicos inespecíficos como debilidad, depresión, anorexia, pérdida cónica de peso, palidez de mucosas, fiebre y edema periférico, especialmente en miembros posteriores y escroto. Además las tendencias hemorragíparas, la linfadenopatía, la esplenomegalia, las anormalidades oculares, poliartropatías, signos neurológicos y las infecciones secundarias se consideran indicadores de Ehrlichiosis crónica. Frecuentemente se puede encontrar sangrado por trombopatía, como petequias, equimosis y epistaxis dérmicas y de membranas mucosas. Los perros con Ehrlichiosis crónica pueden morir por infecciones bacterias secundarias o por hemorragias incontrolables. (Baneth 2006; Kirk *et al* 1999; Waner *et al* 2000)

Los signos neurológicos pueden ocurrir tanto en la enfermedad aguda como crónica, estos se deben a hemorragias, infiltración celular extensa y compresión perivascular de las meninges, meningitis, meningoencefalitis y vasculitis. Pueden aparecer signos neuromusculares generalizados como polimiositis con tetraparesia progresiva de aparición aguda, hiporeflexia y consunción muscular. Es posible que los perros con ehrlichiosis presenten claudicaciones con andar endurecido por la poliartropatía, la cual puede ser producida por hemorragias en la articulación o por deposición de complejos inmunes con artritis como resultado y efusión neutrofílica en la articulación. (Baneth 2006)

Las manifestaciones oculares causadas por la Ehrlichiosis incluyen uveítis anterior, queratoconjuntivitis, hipema, glaucoma, corioretinitis, desprendimiento de la retina, opacidad corneal (edema y depósito de precipitados celulares), tortuosidad de vasos retinales y lesiones corio-retinales focales (manchas pigmentadas rodeadas de áreas de hiper reflectividad). Puede haber desprendimiento de la retina y ceguera debido a hemorragias subretinales. La enfermedad renal en la Ehrlichiosis ha sido asociada con la glomerulonefritis. (Baneth 2006; Waner *et al* 2000)

4.1.7 Hallazgos de Laboratorio

Es común encontrar trombocitopenia (90% de los casos), leucopenia, anemia normocítica normocrómica no regenerativa, monocitosis y linfocitosis. Estas anomalías hematológicas rara vez se presentan de manera simultánea y son más típicas diferentes combinaciones. (Baneth 2006; Kirk *et al* 1999)

Los perros con Ehrlichiosis pueden desarrollar infecciones de vías urinarias, septicemia o infecciones oportunistas, que suelen deberse a disminución del número y la función de los leucocitos. (Kirk *et al* 1999)

Es posible detectar incrementos leves de la actividad de enzimas hepáticas como aminotransferasa de alanina (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), aumentos del nitrógeno de la urea sanguínea (BUN) y la creatinina; aunque muchas veces estos valores suelen ser normales. (Baneth 2006; Kirk *et al* 1999)

Es frecuente observar hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Los resultados de las pruebas rutinarias de coagulación, tiempos de protombina (TP) y parcial tromboplastina activada (TPTa) y productos de degradación de la fibrina (PDF) son generalmente normales, a menos que un proceso patológico secundario inicie coagulación intravascular diseminada (CID). Sin embargo, debido a la trombocitopatía y trombocitopenia grave, suelen estar

prolongados los tiempos de sangría y retracción del coágulo. (Baneth 2006; Kirk *et al* 1999)

En la fase crónica de la enfermedad los perros presentan hipergammaglobunemia e hipoalbuminemia; la magnitud del incremento de las globulinas gamma se correlaciona con la duración de la enfermedad. Después del tratamiento las gammopatías suelen resolverse en el transcurso de tres a cinco meses. Sin embargo, en algunos casos, pueden requerir hasta 15 meses para que las globulinas se normalicen. Los perros con Ehrlichiosis crónica desarrollan en su mayoría, pancitopenia como resultado de que la medula ósea se vuelve hipocelular; por lo que el pronóstico de la Ehrlichiosis crónica es grave. (Kirk *et al* 1999)

En la Ehrlichiosis canina también se afectan los riñones por factores humorales. En las afecciones agudas es común que se altere la permeabilidad glomerular. La pérdida de proteína depende de una glomerulopatía de cambios mínimos. Una patogenia de tipo inmunitario explicaría la falta de respuesta ocasional de la glomerulonefritis a la antibioticoterapia apropiada en casos crónicos. (Kirk *et al* 1999)

Las reacciones inmunomediadas juegan un papel más grande en la patogénesis de la infección por *E. canis*. El *Hepatozoon canis* y *Babesia canis vogeli* son hemoparásitos que son transmitidos por el mismo vector *R. sanguineus*. (Birchard *et al.* 2002, Baneth 2006)

4.1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la anamnesis, presentación clínica, hallazgos patológicos al examen clínico y se confirma con las pruebas de laboratorio. (Waner *et al* 2000)

Dentro de las pruebas de laboratorio que se pueden realizar encontramos la prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA); realizar un hemograma completo para detectar anormalidades; prueba de Inmunoabsorvencia ligada a enzimas (ELISA); reacción de cadena de polimerasa (PCR) y los frotis sanguíneos o aspirados de bazo teñidos con Giemsa. (Baneth 2006; Kirk *et al* 1999; Waner *et al* 2000)

Los cambios hematológicos que pueden encontrarse son: trombocitopenias, anemia, por lo general, no regenerativas, y leucopenias. También pueden observarse la hiperglobulinemia. Puede confirmarse la infección por la visualización de las mórulas en los monocitos en frotis sanguíneos o aspirados de bazo teñidos con Giemsa, pero solo aparecen en el 4% de los pacientes enfermos por lo cual no debe ser el método de elección. Se puede ampliar la sensibilidad de esta técnica mediante la realización de frote de capa flogística o frote de sangre obtenida de capitales del margen de pabellón auricular. (Waner *et al* 2000)

La prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA) usando antígenos de *E. canis* es el test serológico de diagnóstico más aceptable; ya que pueden detectar enfermos a partir de los 7 días después de la infección inicial, a pesar que posiblemente algunos perros no se tornen seropositivos hasta los 28 días después de la infección inicial, con lo cual luego de un diagnóstico negativo deben repetirse el examen a la 2 o 3 semanas. Después del tratamiento, los anticuerpos declinan gradualmente y se tornan negativos entre los 6 y los 9 meses, aunque algunos perros mantienen los niveles de anticuerpos altos de por vida, sin saber si el microorganismo persiste en el organismo por lo que se supone que el paciente se ha recuperado de la infección cuando resuelve la trombocitopenia, la hiperglobulinemia y otras anormalidades clínicas y de laboratorio de forma progresiva. Otros métodos, usados principalmente en investigación, son cultivos sanguíneos para evaluar el crecimiento del parásito, que puede tardar hasta 8 semanas en mostrar crecimiento, PCR puede utilizarse

para la detección de *E. canis* dentro de los 4 a 10 días posinoculación. El diagnóstico de la enfermedad subclínica es un desafío para el clínico. (Kirk *et al* 1999; Waner *et al* 2000)

En fases iniciales de la infección aguda y en animales moribundos se pueden encontrar títulos negativos, en los primeros por no haber dado tiempo a la producción de una respuesta humoral y en los segundos por agotamiento de la producción de anticuerpos. (Weisiger *et al*, 1975; Waner *et al*, 2001; Cohn, 2003).

4.1.9 Tratamiento

La terapia para la Ehrlichiosis canina consiste en agentes antirriketsiales y terapia de apoyo. Los fármacos de elección son tetraciclinas, el tratamiento de elección para la fase aguda es la doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg una vez por día o 5 mg/kg dos veces por día, durante 28 días como mínimo, pudiendo extenderse hasta 2 meses. La doxiciclina es la tetraciclina más liposoluble que se absorbe con mayor facilidad obteniéndose concentraciones sanguíneas, tisulares e intracelulares más altas. Las tetraciclinas se pueden dar a dosis de 22 mg/kg cada 12 a 24 horas por 21 días como mínimo. Los animales en la fase subclínica pueden necesitar un tratamiento más prolongado en comparación con los perros que sufren la etapa aguda. (Kirk *et al* 1999; Waner *et al* 2000)

Es posible que el mecanismo mediante el cual *E. canis* sobrevive y se multiplica en las células infectadas sea su habilidad para inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y la doxiciclina restablece esta fusión en las células infectadas. Por lo general se produce una mejoría clínica del paciente dentro de las 24-48 hrs. de instaurado el tratamiento, el recuento plaquetario comienza a aumentar también a partir de este período restableciéndose al recuento normal a los 14 días. El tratamiento debe de realizarse por un período mínimo de tres semanas, ya que algunos perros pueden volverse portadores en caso de dar el tratamiento durante menos tiempo. (Baneth 2006; Waner *et al* 2000)

Otros medicamentos que se han utilizado con éxito incluyen cloranfenicol, dipropionato de imidocarb o amicarbalida, combinado con Doxiciclina para el tratamiento cuando hay una coinfección con *Babesia*. Las quinolonas tienen ciertos efectos antirrikettsiales, pero estudios realizados indican que no son útiles en la Ehrlichiosis canina. (Baneth 2006, Kirk *et al* 1999, Waner *et al* 2000)

Además de la antibióticoterapia según el estado del paciente, es posible que sea necesaria la administración de fluidoterapia de apoyo para la deshidratación o transfusiones sanguíneas si el paciente presenta un grave estado anémico. Las transfusiones sanguíneas no aumentan significativamente las plaquetas por lo que a menudo es necesario administrar un plasma rico en plaquetas. (Kirk *et al* 1999)

Durante la etapa inicial de la terapéutica puede ser útil la corticoterapia inmunosupresora a corto plazo para la trombocitopenia grave que puede amenazar la vida del perro. El tratamiento puede darse por dos a siete días con corticoides, como prednisolona, en dosis inmunosupresoras de 2 mg/kg. La respuesta inmune desencadenada por la enfermedad en cierta forma es la responsable de la trombocitopenia y los demás signos de la enfermedad por lo cual disminuir o suprimir esta respuesta inmune resulta beneficioso para el enfermo. (Kirk *et al* 1999)

Algunos perros con Ehrlichiosis crónica no responden a la antibióticoterapia estándar, por lo que es posible que tengan alteraciones renales o medulares óseas irreversibles. Asimismo, puede que estos pacientes que no muestran mejoría clínica después del tratamiento, debe considerarse otra causa de enfermedad o una causa que la agrava, por lo cual hay que realizar el diagnóstico de enfermedades coexistentes (*Bartonella spp.* y *Babesia canis* y *Hepatozoon canis*) como las mencionadas anteriormente. (Kirk *et al* 1999, Waner *et al* 2000)

Como el tratamiento de la forma crónica severa de la enfermedad es prolongado y el pronóstico de esos perros pancitopénicos es grave, es posible que en estos casos se pueda utilizar filgastrim o eritropoyetina. (Birchard *et al.* 2002)

4.1.10 Profilaxis

El control de las garrapatas es la medida de prevención más eficaz contra la infección de *E. canis*. En las perreras deben realizarse test serológicos y control de garrapatas antes de ingresar a los perros a la misma. Los perros de regiones endémicas y aquellos que viajan hacia o desde áreas endémicas deben ser considerados como candidatos potenciales a enfermarse. La enfermedad no deja protección por lo que un paciente curado de ehrlichiosis puede volver a infectarse, sobre todo cuando viven en ambientes endémicos. (Waner *et al* 2000)

4.2 *Rhipicephalus sanguineus*

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* pertenece al grupo de las garrapatas duras (familia *Ixodidae*) y es el vector de la Ehrliquiosis Monocítica Canina (EMC); comúnmente se le conoce como “garrapata marrón del perro”. Es originaria de África y es una de las garrapatas más distribuidas del mundo, ya que ha migrado por medio del hombre y sus perros. (Tatchell 1967, Sauer *et al*, 1986, Fisher 2006)

4.2.1 Huéspedes

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* afecta principalmente al perro, pero también puede afectar a una gran variedad de mamíferos y aves terrestres; se pueden mencionar a los gatos, venados, bovinos, liebres, cabras, caballos, borregos, leones, aves (avestruz, pavo, garza), reptiles y el hombre. Es importante mencionar que el perro siempre es el huésped definitivo de elección para la garrapata cuando está presente. (Mehlhorn 1994, Rojas 2001)

4.2.2 Localización en el huésped

Rhipicephalus sanguineus en el perro se localiza en orejas, cuello y en los espacios interdigitales. En perros con altas infestaciones de garrapatas todos los estados activos pueden ser encontrados atacando partes del cuerpo con pelo. (Rojas 2001)

4.2.3 Ciclo biológico

Esta garrapata es encontrada en los huéspedes a lo largo de todo el año en zonas tropicales y subtropicales; mientras que en áreas templadas, donde hay cambios climáticos, las garrapatas son encontradas en el huésped a lo largo del verano y pocas en invierno. (Alcaíno *et al.* 1990, Fisher 2006, Rojas 2001)

Las etapas inmaduras en la naturaleza se alimentan de los mamíferos pequeños; los perros generalmente son los únicos huéspedes en las etapas inmaduras y adultas. (Breitschwerdt 2003, Rojas 2001)

El ciclo de *R. sanguineus* es de tres hospederos, lo que significa que cada uno de las fases móviles después de alimentarse de sangre por unos días, deben de abandonar a los huéspedes para evolucionar en el medio ambiente. La duración del ciclo biológico depende de factores ambientales como la temperatura y humedad. La temperatura óptima para la incubación de los huevos, la transformación de larvas en ninfas y de éstas en adultos, es de 30°C; el período de cada una de estas etapas se alarga conforme baja la temperatura; mientras que el rango de humedad es más amplio y va de 20 – 93%. En condiciones ambientales ideales el ciclo se completa en aproximadamente 63 días, pero si el ambiente no es favorable el ciclo se puede prolongar por varios meses, durante los cuales la garrapata permanece oculta en un estado de letargia denominado día pausa. (Alcaíno 1990, Fisher 2006, Mehlhorn 1994, Vásquez 1999)

Las hembras repletas realizan una puesta aproximadamente de 4000 huevos, luego de un período de pre ovoposición que va desde 3 a 83 días, los huevos los ponen en lugares protegidos de la luz y de la desecación. Los huevos de garrapata eclosionan entre los 8 y 67 días; las larvas pasan por un período de maduración tras el cual están capacitadas para fijarse a un primer huésped para alimentarse. Entre los 3 y 7 días post fijación, la larva se suelta y busca un lugar resguardado donde realizar su primera muda y se vuelven ninfas que aparecen entre los 6 y los 23 días después de la caída de la larva repleta y están preparadas para subir a un segundo huésped para volver a alimentarse. Se alimenta por 4 a 9 días pasados los cuales la ninfa repleta se suelta del huésped, cae al suelo y busca un sitio resguardado para realizar la segunda muda a partir de la cual emergerán los adultos entre los 12-129 días después, ya que las ninfas pueden sobrevivir más de 568 días en espera de un huésped. Los machos y hembras adultos se fijan a un tercer huésped para alimentarse; las hembras sólo se fijan y succionan sangre una vez y caen al suelo, mientras que los machos se alimentan en forma intermitente y persisten más tiempo sobre el hospedador, para que la mayoría de las hembras queden fecundadas. Estas, una vez alimentadas, caen al suelo y buscan un refugio donde realizar la puesta de huevos y empieza de nuevo el ciclo. (Breitschwerdt 2003, Alcaíno 1990, Mehlhorn 1994, Vásquez 1999)

4.2.4 Control

Las garrapatas se pueden controlar de varias formas, por medio de depredadores (hormigas, roedores, aves y otros), modificando el medio (revestir áreas con cemento, etc.), el clima es una gran ayuda en el control de garrapatas, o el uso de medios físicos y químicos. Debido a las diferencias de hábitos entre las diversas especies de garrapatas, en un programa de control deben de determinarse la o las especies que se desean controlar, ya que un plan que es efectivo contra una especie de un solo huésped, puede no funcionar con otra de 3

huéspedes, por lo que es indispensable la identificación, al menos del género, de la garrapata que se quiere controlar. (Kidd 2003, Fisher 2006, Rojas 2001)

Se deben realizar baños con garrapaticidas y la periodicidad de éstos varía de acuerdo con la especie de la garrapata que se desea combatir; está determinado por los días en que se alimentan los diferentes estadios evolutivos, se debe buscar que todos los estadios sean atacados por el ixodicida, con el fin de romper el ciclo. Cuando la garrapata es de tres huéspedes, como la *Rhipicephalus sanguineus*, hay que considerar que los estadios inmaduros (larvas y ninfas) pueden no estar en el huésped definitivo, por lo que es necesario también realizar control de las garrapatas en el medio ambiente. Es importante recordar que todos los animales del hogar deben ser tratados para el control de garrapatas. (Fisher 2006, Rojas 2001)

4.3 Respuesta Inmune

Son todos aquellos eventos desarrollados por el sistema inmune, con el objeto de defender la integridad biológica del individuo frente a cualquier agresión (estimulo antigénico). El sistema inmune se encuentra ubicado en los órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, timo y médula ósea) y en su acción participan una serie de células y moléculas, entre las que destacan las inmunoglobulinas. (Pena 2005, Tizar 2009)

4.3.1 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas en una o varias unidades estructurales básicas. La función esencial de las inmunoglobulinas es la de unirse al antígeno; así las inmunoglobulinas actúan como receptoras de señales antigénicas o bien pueden colaborar en la destrucción antigénica. (García 2005, Tizar 2009)

4.3.1.1 Inmunoglobulina G (IgG)

Son las inmunoglobulinas más abundantes y representan más del 70 % de las Igs séricas totales. La IgG está formada y secretada por las células plasmáticas del bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea. Es la inmunoglobulina que alcanza mayor concentración en la sangre (1,000 – 2,000 mg/dl en el perro) y por esta razón juega un papel primordial en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. (García 2005, Pena 2005, Tizar 2009)

Es la inmunoglobulina más pequeña y debido a esto puede extravasarse de los vasos sanguíneos más factiblemente que las otras. Esto es importante en la inflamación, donde el incremento de la permeabilidad vascular permite a la IgG participar en la defensa de los tejidos y superficies corporales. La IgG se une a antígenos específicos, tales como los que se encuentran en la superficie de las bacterias. (García 2005, Pena 2005, Tizar 2009)

La IgG se sintetiza tardíamente tras un primer contacto con el antígeno, sin embargo, tras un segundo contacto la mayoría de las inmunoglobulinas que se forman son IgG; que son las que predominan en las respuestas secundarias del sistema inmune, la cual es permanente en su acción. (García 2005, Pena 2005, Tizar 2009)

4.3.1.2 Inmunoglobulina M (IgM)

Los anticuerpos del tipo IgM son los que más rápidamente se forman en respuesta a un estímulo antigénico, predominan en las respuestas primarias del sistema inmune. Representa del 5 al 10 % de las inmunoglobulinas séricas totales, en el suero de los perros es la segunda clase en cuanto concentración, luego de la IgG. Es producida por las células plasmáticas en el bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea; no atraviesa activamente las membranas biológicas, lo que hace que esta inmunoglobulina ejerza su acción normalmente en los espacios intravasculares. (García 2005, Pena 2005, Tizar 2009)

La IgM es la principal inmunoglobulina producida durante la respuesta inmune primaria, también se produce en las respuestas secundarias, pero esto pasa desapercibido por el predominio de IgG. Dado que son muy grandes las moléculas de IgM rara vez entran en fluidos tisulares, ni siquiera en los lugares de inflamación aguda. (García 2005, Pena 2005, Tizar 2009)

4.3.1.3 Inmunoglobulina A (IgA)

La IgA es secretada por las células plasmáticas localizadas bajo las superficies corporales, por lo que se produce en las paredes del intestino, tracto respiratorio, sistema urinario, piel, glándula mamaria, etc. Su concentración en el suero de la mayoría de los mamíferos es generalmente más baja que la IgM. (García 2005, Tizar 2009)

La IgA producida en las superficies corporales atraviesa las células epiteliales hacia las secreciones externas unidas al componente secretor, el cual la protege de la digestión por las proteasas intestinales. La IgA secretora es la inmunoglobulina principal en las secreciones externas de los mamíferos no rumiantes; como tal es crítica en la protección del tracto intestinal, respiratorio y urogenital, la glándula mamaria y los ojos, frente a invasión microbiana. La IgA impide la adherencia de microorganismos invasores a las superficies corporales, esto es importante porque así protegen precisamente los puntos más vulnerables del organismo, las puertas de entrada al mismo, como son ojos, boca, aparato digestivo, sistema respiratorio, vagina, etc. (García 2005, Tizar 2009)

4.3.1.4 Inmunoglobulina E (IgE)

Es producida por las células plasmáticas localizadas bajo las superficies corporales, está presente en concentraciones muy bajas en el suero, por lo que no puede actuar uniendo y recubriendo los antígenos, como lo hacen las demás. La IgE inicia la inflamación aguda actuando como una molécula transductora de señales, cuando el antígeno se une a la IgE dispara la liberación rápida de

moléculas inflamatorias a partir de los mastocitos. La inflamación aguda resultante potencia las defensas locales y ayuda a eliminar al invasor. La IgE media las reacciones de hipersensibilidad de tipo I y es gran medida la responsable de la inmunidad frente a parásitos helmintos. La IgE es una de las inmunoglobulinas con la vida media más corta (2 a 3 días) y es destruida rápidamente por los tratamientos térmicos suaves. (Parola y Raoult 2001, García 2005, Tizar 2009)

4.4 Prueba de ELISA

Entre las pruebas más importantes de inmunoanálisis empleadas en medicina veterinaria está el análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), esta puede emplearse para detectar y medir tanto anticuerpos como antígenos. La prueba de ELISA es una reacción serológica que utiliza conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. Se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, que generalmente es peroxidasa, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo queda inmobilizada y es revelada mediante la adición del sustrato, que cuando actúa sobre la enzima, produce un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro. (Sánchez 2004, Tizar 2009)

En la actualidad el ELISA es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico serológico de distintas enfermedades infecciosas. La prueba de ELISA puede ser cualitativa (indica presencia o ausencia de un antígeno o anticuerpo determinado) o cuantitativa (indica la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la muestra). (Sánchez 2004, Tizar 2009)

4.4.1 Detección de antígenos:

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA tipo Sandwich; en la que la placa suele venir con un anticuerpo fijado (anticuerpo de captura) frente al antígeno problema, sobre el cual se añade la muestra a analizar, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, se pone en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima; luego se añade el substrato para revelar la reacción. En este análisis, la intensidad de color de la reacción se relaciona directamente con la cantidad de antígeno unida. Debido a que estas pruebas implican la formación de capas de anticuerpo-antígeno-anticuerpo, se denominan ELISA tipo sándwich. (Sánchez 2004, Tizar 2009)

4.4.2 Detección de anticuerpos:

Para la determinación de anticuerpos específicos frente a un determinado antígeno existen dos modalidades del método: ELISA indirecto y ELISA competición.

- ELISA indirecto: éste es el método más utilizado para la determinación de anticuerpos; consiste en la inmovilización a la placa de ELISA del antígeno (en los Kits ya viene fijado) del que queremos conocer si en la muestra problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales, proteínas bacterianas y virus completos; se añade la muestra, se incuba y lava; luego se adiciona el conjugado, incuba y lava, por último se adiciona el sustrato, el frenado de la reacción y se procede a dar lectura a los resultados. (Harrus 2002, Sánchez 2004, Tizar 2009)
- ELISA de competición: esta modalidad parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competición ya que el suero

problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa y por tanto compete con él. Los pasos que le siguen son la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y se procede a dar lectura a los resultados. (Sánchez 2004, Tizar 2009)

Recientemente se han comercializado pruebas serológicas de muestreo que emplean la tecnología ELISA, para su empleo rápido en la propia clínica veterinaria, con un valor cualitativo y no cuantitativo. La prueba de ELISA requiere un equipo mínimo y permite un diagnóstico serológico de EMC en un tiempo corto; se considera que es una prueba clínica auxiliar de diagnóstico serológico, cuya sensibilidad es del 98.8% y especificidad del 100%. (Bélanger, *et al.* 2002, Cárdenas *et al.* 2007, Chandrashekar *et al.* 2010, Idexx Laboratories 2008)

4.4.3 Fundamento de la prueba

- Paso 1. El antígeno es ligado cuando el anticuerpo de la enzima específica del conjugado y la muestra de sangre son combinados en el vial para ser introducido al dispositivo de la prueba, la matriz es pre sembrada con anticuerpos específicos del antígeno.
- Paso 2 y 3. El antígeno y el conjugado se unen en la matriz ligada de anticuerpo activando el dispositivo.
- Paso 4. La fase de lavado remueve los componentes no ligados y no específicos del conjugado y la muestra de sangre del fondo de la matriz para el paso final.
- Paso 5. El sustrato se mueve a través de la matriz limpia y este reacciona con el conjugado para amplificar la presencia del antígeno para incrementar la sensibilidad y eliminar errores; la lectura es de color azul, la cual varía en su intensidad desde muy suave a fuerte. (Idexx Laboratories 2008)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Descripción del área de estudio

- Centro Veterinario Campestre, Fraijanes, Guatemala.

Nombre Oficial:	Municipio de Fraijanes
Ubicación Geográfica:	28 kilómetros del centro de la capital
Extensión Territorial:	92 kilómetros cuadrados
Habitantes:	30,701
Límites Geográficos:	NORTE: Municipio de Santa Catarina Pinula
	SUR: Municipio de Barberena
	ESTE: Municipio de Villa Canales
	OESTE: Municipios de San José Pinula, Santa Rosa de Lima, y Santa Cruz Naranjo
Moneda:	Quetzal
Idioma:	Español
Forma de Gobierno:	Concejo Municipal
Altitud:	4000-6000 pies
Precipitación:	1500 milímetros
Temperatura Promedio:	20 y 22 grados centígrados
Humedad Promedio:	60% - 88%
Suelo:	Origen volcanico
Feria Titular:	31 de Enero al 6 de Febrero
Aldeas, Caceríos y Colonias:	Puerta del Señor, Lo de Diéguez, El Cerrito, Los Verdes, Canchón, Pavón, Rabanales, El Chocolate, Pueblo Viejo, San Arturo, Las Crucitas, Joya Verdes.

5.2 Recursos Humanos

- Estudiante tesista
- Profesionales asesores
- Asistente veterinario

5.3 Material Biológico

Treinta muestras sanguíneas de perros que asistieron a la clínica veterinaria en Fraijanes Guatemala, con antecedentes de garrapatoxis, durante el periodo comprendido de Diciembre 2011 a Febrero 2012.

5.4 Materiales y equipo

5.4.1 Recursos de laboratorio

5.4.1.1 Equipo eléctrico

- Refrigeradora a 5°C

5.4.1.2 Materiales y equipo de laboratorio

- Algodón
- Guantes de látex
- 30 Kits SNAP 4Dx Canino (IDEXX Laboratories)
- Jeringas de 3cc
- Tubos con EDTA
- Termómetro
- Estetoscopio
- Linterna
- Vaselina

5.4.1.3 Soluciones

- Alcohol al 50%

5.4.1.4 Otros recursos

- Lapicero
- Papel
- Computadora
- Impresora
- Cámara fotográfica
- Reloj

5.4.2 Centros de referencia

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- Biblioteca del Centro Veterinario Campestre, Fraijanes, Guatemala.
- Internet

5.5 Metodología

5.2.1 Localización del área de estudio

Centro Médico Veterinario Campestre ubicado en: Km. 17.5 Carretera a El Salvador Arrazola I lote 65, Fraijanes, Guatemala.

5.2.2 Metodología de campo

Se tomó por conveniencia 30 muestras de sangre de 30 perros que asistieron a la clínica veterinaria en Fraijanes, que tuvieran antecedentes de haber padecido garrapatoxis; durante el período comprendido de Diciembre 2011 a Febrero 2012. Se realizó un examen clínico general de los pacientes (temperatura corporal, condición corporal, peso, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, llenado capilar y coloración de mucosas); con el fin de evaluar estado físico general.

El criterio de inclusión se basó en:

- Pacientes que tenían más de 20 días de haber sido parasitados por garrapatas, ya que los anticuerpos (IgG) contra *Ehrlichia canis*, se desarrollan a partir de los 15 días post-infección.

El criterio de exclusión se basó en:

- Pacientes que no tenían historia de garrapatoxis
- Pacientes que no pertenecían al municipio de Fraijanes, Guatemala
- Animales moribundos, ya que se pueden encontrar títulos negativos por agotamiento de la producción de anticuerpos
- Pacientes condición corporal 1, utilizando la escala de 1 a 5, donde 1 es muy bajo de peso y 5 obeso.

Se tomó 1ml de muestra de sangre de la vena cefálica de los pacientes calificados y se procesaron las muestras según el procedimiento de la prueba SNAP 4Dx Canino (IDEXX Laboratories), de la siguiente forma:

- Se almacenó los kits en la refrigeradora.
- Antes de procesar la muestra se sacó el kit de la refrigeradora y se esperó que los componentes del kit llegaran a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Con la pipeta del kit se tomó 3 gotas de muestra en un tubo de ensayo nuevo.
- Se agregó 4 gotas del conjugado al tubo de ensayo sosteniendo la botella en posición vertical.
- Se tapó el tubo de ensayo y se mezcló, durante 15 segundos, dándole 5 giros de 180°.

- Se colocó el dispositivo sobre una superficie horizontal, agregando todo el contenido el tubo de ensayo en el pocillo de muestras, teniendo cuidado de no verter el contenido fuera de dicho pocillo.
- La muestra fluyo por la ventana de resultados, alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30 – 60 segundos.
- Cuando apareció el color en el círculo de activación, se presionó el activador con firmeza hasta quedar al ras con el cuerpo del dispositivo.
- Se leyeron los resultados del análisis cuando pasaron ocho minutos. (Idexx Laboratories 2011)

5.2.3 Interpretación del resultado de la prueba

Para determinar el resultado de la prueba leí los puntos de reacción en la ventana de resultados y comparé la intensidad del punto de la muestra con la del punto de control positivo. (Idexx Laboratories 2011)

5.2.3.1 Resultados positivos

Cualquier desarrollo de color en los puntos de la muestra indica la presencia de anticuerpo frente a *E. canis* en la muestra. (Idexx Laboratories 2011)

5.2.3.2 Resultados negativos

Solamente se produce color en el punto de control positivo. (Idexx Laboratories 2011)

5.2.3.3 Resultados inválidos

Fondo: Es posible que se produzca color de fondo si se permite que la muestra fluya sobrepasando el círculo de activación. (Idexx Laboratories 2011)

No se produce color: Si en el punto del control positivo no se produce color. (Idexx Laboratories 2011)

5.6 Método estadístico

Para el análisis de las muestras se utilizó el método descriptivo estableciendo el porcentaje de positivos y negativos; así mismo se estableció la asociación entre edad, raza, sexo, lugar donde se encuentre el perro y signología, con la reacción positiva a la prueba, en base a la prueba de independencia χ^2 . Los resultados se presentaron en cuadros y gráficas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados

Se utilizaron 30 perros con antecedentes de garrapatoxis en el municipio de Fraijanes, Guatemala; durante el período comprendido entre diciembre 2011 a febrero 2012. Del total de las muestras, 2 perros (7%) presentaron anticuerpos circulantes contra *E. canis*, mientras que 28 perros (93%) no presentaron anticuerpos circulantes contra *E. canis*. (Tabla No.1, Gráfica No.1)

Tabla No. 1: Número de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.

	No. DE MUESTRAS	%
POSITIVOS	2	7%
NEGATIVOS	28	93%
TOTAL	30	100%

Gráfica No.1: Porcentaje de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.



Los dos perros que presentaron anticuerpos contra *E. canis* fueron, un macho sin raza definida de 8 años de edad y una hembra de raza Labrador Retriever de 5 años de edad. Ambos perros viven dentro y fuera de la casa y de ellos ninguno presentó signos clínicos de la enfermedad.

Se utilizó la prueba de Chi cuadrado como prueba de independencia para determinar la asociación entre la seropositividad de anticuerpos contra *E. canis* y la asociación entre la edad de los perros bajo estudio. Por lo que se concluyers que no existe asociación entre la edad del perro y la presencia de anticuerpos contra *E. canis*. (Tabla No.2, Grafica No.2)

Tabla No. 2: Rango de edades de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.

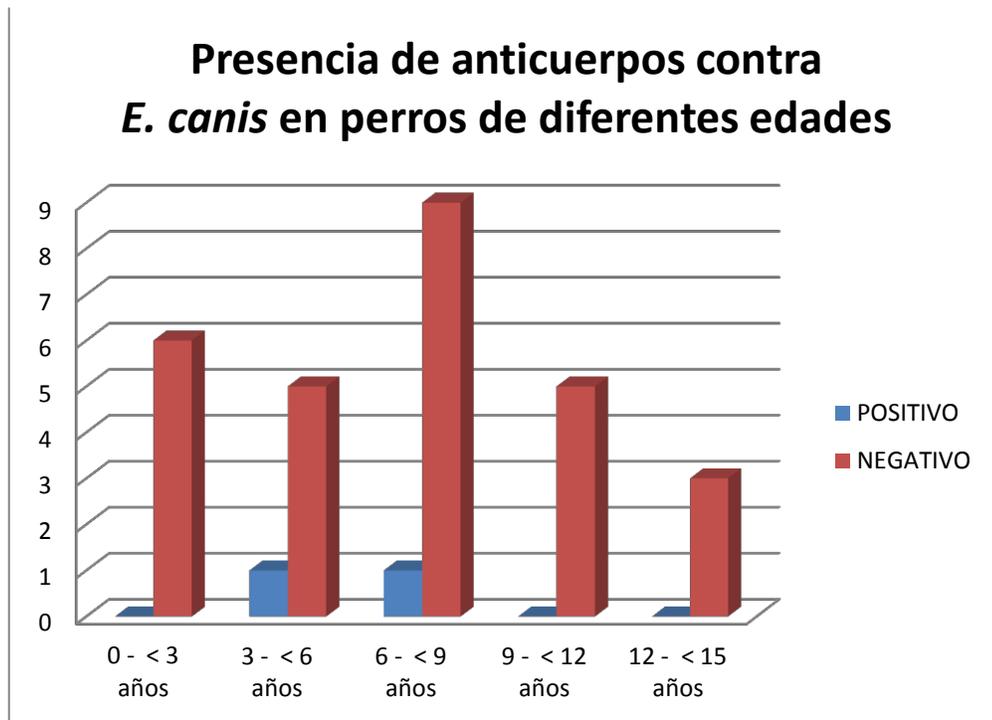
EDAD	PRESENCIA DE ANTICUERPOS		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
0 - < 3 años	0	6	6
3 - < 6 años	1	5	6
6 - < 9 años	1	9	10
9 - < 12 años	0	5	5
12 - < 15 años	0	3	3
TOTAL	2	28	30

Chi cuadrada calculada = 0.336

Chi cuadrada teórica = 9.49

Grado de confianza = 5%

Gráfica No. 2: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros de diferentes edades con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.



Para determinar la asociación entre la seropositividad de anticuerpos contra *E. canis* y la raza de los perros, fueron utilizadas en el estudio las razas Labrador Retriever, French Poodle, Pastor Alemán, Schnauzer, Pug, Golden Retriever, Chihuahua, Shih Tzu y perros sin raza definida (SRD), con lo que se estableció que no hay asociación entre la raza y la presencia de anticuerpos contra *E. canis* al realizar la prueba de Chi cuadrado. (Tabla No. 3, grafica No.3)

Tabla No. 3: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros de diferentes razas con historia de garrapatosis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.

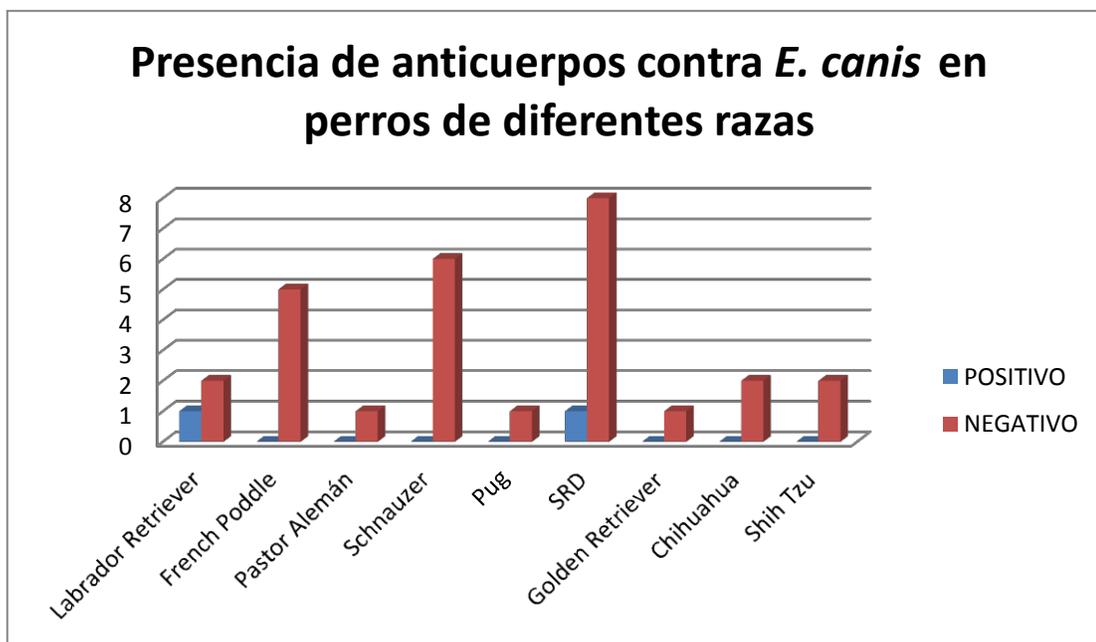
RAZA	PRESENCIA DE ANTICUERPOS		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
Labrador Retriever	1	2	3
French Poddle	0	5	5
Pastor Alemán	0	1	1
Schnauzer	0	6	6
Pug	0	1	1
SRD	1	8	9
Golden Retriever	0	1	1
Chihuahua	0	2	2
Shih Tzu	0	2	2
TOTAL	2	28	30

Chi cuadrada calculada = 2.66

Chi cuadrada teórica = 15.51

Grado de confianza = 5%

Gráfica No.3 Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros de diferentes razas con historia de garrapatosis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.



En la prueba de Chi cuadrado como prueba de independencia para determinar la asociación entre la seropositividad de anticuerpos contra *E. canis* entre el sexo (macho y hembra) de los perros bajo estudio, se determinó que no hay asociación entre el sexo del perro y la presencia de anticuerpos contra *E. canis*. (Tabla No. 4; Gráfica No. 4)

Tabla No. 4: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros de diferente sexo con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.

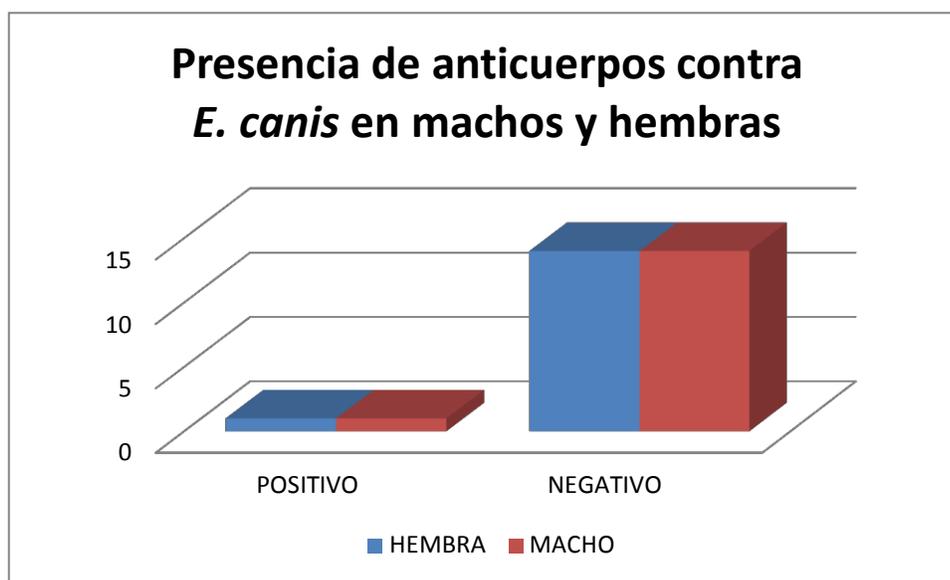
SEXO DEL PERRO	PRESENCIA DE ANTICUERPOS		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
HEMBRA	1	14	15
MACHO	1	14	15
TOTAL	2	28	30

Chi cuadrada calculada = 0

Chi cuadrada teórica = 3.84

Grado de confianza = 5%

Gráfica No. 4: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros de diferente sexo con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.



Para ver la asociación que hay entre la seropositividad de anticuerpos contra *E. canis* y la presencia o ausencia de signos en los perros, utilicé la prueba de Chi cuadrado como prueba de independencia. Con lo que se determinó que no hay asociación entre presencia de signos clínicos y presencia de anticuerpos contra *E. canis*. (Tabla No. 5, Gráfica No.5.)

Tabla No. 5: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros con presencia o ausencia de signos clínicos en perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.

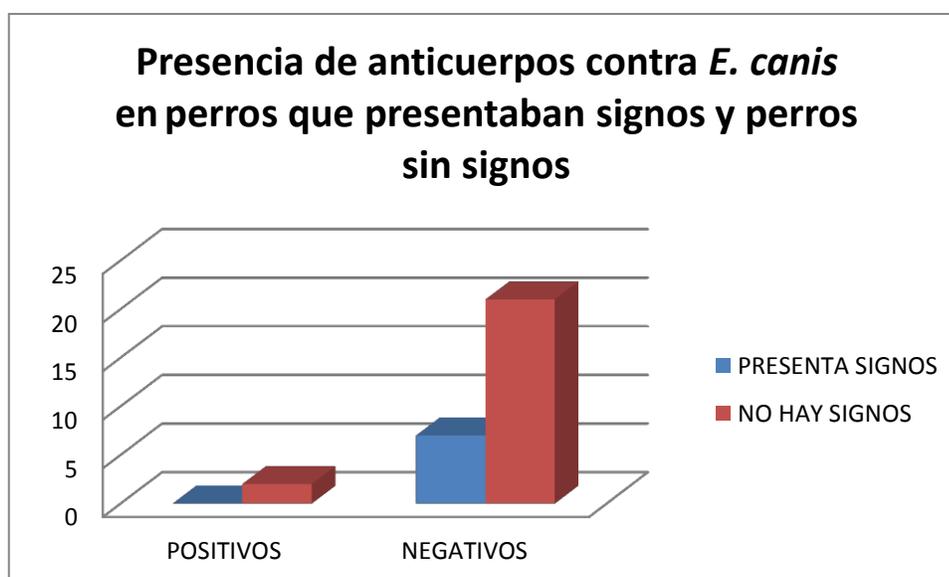
SIGNOLOGIA	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
PRESENTA SIGNOS	0	7	7
NO HAY SIGNOS	2	21	23
TOTAL	2	28	30

Chi cuadrada calculada = 0.0326

Chi cuadrada teórica = 3.84

Grado de confianza = 5%

Gráfica No. 5: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* en perros con presencia o ausencia de signos clínicos en perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.



Así mismo se utilizó la prueba de Chi cuadrada como prueba de independencia, para poder ver la asociación que hay en la serpositividad de anticuerpos contra *E. canis* y el lugar donde vive la mascota. Dentro del estudio se clasificó a los perros en tres grupos, los que viven exclusivamente fuera de casa (patio, jardín, calle, terraza, etc.), los que viven solamente dentro de la casa y los que viven en ambos lados (dentro y fuera de casa). Por lo que se dice que no hay asociación entre el lugar en donde vive el perro y la presencia de anticuerpos contra *E. canis*. (Tabla No.6. Gráfica No.6)

Tabla No. 6: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* según el lugar donde viven los perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.

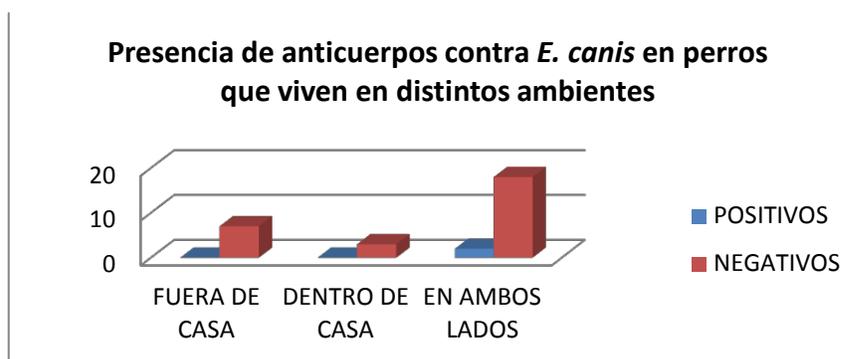
LUGAR DONDE VIVE EL PERRO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
FUERA DE CASA	0	7	7
DENTRO DE CASA	0	3	3
EN AMBOS LADOS	2	18	20
TOTAL	2	28	30

Chi cuadrada calculada = 0.1651

Chi cuadrada teórica = 5.99

Grado de confianza = 5%

Gráfica No. 6: Presencia de reactores positivos y negativos a *E. canis* según el lugar donde viven los perros con historia de garrapatoxis atendidos en la clínica veterinaria en el período Diciembre 2011-Febrero 2012.



6.2 Discusión

Es importante determinar la presencia de *E. canis* en nuestro país, debido a que es una enfermedad infecciosa, mortal y de fácil propagación. Para obtener una muestra más homogénea se muestreo 15 machos y 15 hembras. Del total de la muestra, se obtuvo dos casos positivos a la presencia de anticuerpos contra *E. canis*, una hembra y un macho. El resultado positivo en el Kit rápido de ELISA 4Dx indicó que los caninos positivos tuvieron contacto con *E. canis*.

En la enfermedad no se han descrito signos patognomónicos, dentro de los signos que pueden presentarse en dos de las tres diferentes fases de la enfermedad (aguda y crónica) están: anorexia, apatía, hematuria, epistaxis, fiebre, anemia, linfadenomegalia, petequias, vómitos, descarga oculonasal serosa a purulenta, claudicación, palidez de mucosas entre otras.

Dentro del estudio, los dos pacientes reactivos positivos a *E. canis* con historia de garrapatoxis se presentaban en fase subclínica asintomática, por lo que es importante diagnosticar la enfermedad ya que la Ehrlichiosis se presenta con signos variables y muy generales con períodos subclínicos, por lo que al haber historia de garrapatoxis debemos de descartar dicha enfermedad

En siete de los pacientes que presentaron diferentes signos (debilidad, anorexia, palidez de mucosas, vómitos, fiebre, hematuria y enterorrea), con historia de garrapatoxis y negativos al test, se diagnosticaron las siguientes patologías: urolitiasis, amebiasis, gastroenteritis, parasitosis por *dipylidium canis* e intoxicación con Dicumarol.

Se realizó el estudio en Fraijanes, Guatemala ya que por ser área suburbana hay muchos perros con infestación de garrapatas y éstas son las que transmiten la *E. canis*. La época del año en la que se trabajó la investigación es

independiente ya que el objetivo de mi estudio era detectar anticuerpos contra *E. canis* y no la presencia de garrapatas en el perro.

Para determinar la asociación que existía entre la presencia de anticuerpos contra *E. canis* y edad, raza, sexo, presencia o ausencia de signos y lugar donde vivía el perro se utilizó la prueba de Chi cuadrado de independencia con lo que determiné que no hay asociación entre la presencia de anticuerpos contra *E. canis* y ninguna de las variables antes descritas.

El 7% del total de perros muestreados son reactores positivos a *E. canis* y con ello queda evidenciada la presencia de *E. canis* en el municipio de Fraijanes.

VII. CONCLUSIONES

1. En el estudio realizado de 30 perros pertenecientes al municipio de Fraijanes, Guatemala, se determinó la presencia de anticuerpos contra *E. canis* en dos perros con historia de garrapatoxis (7%), lo cual confirma la presencia de *E. canis* en el municipio.
2. No hay asociación entre la presencia de anticuerpos contra *E. canis* y las diferentes variables en estudio: edad, raza, sexo, presencia o ausencia de signos clínicos y el lugar donde vive el perro.

VIII. RECOMENDACIONES

1. El Snap 4Dx debe ser utilizado como un método rápido de diagnóstico en clínica para la detección de anticuerpos contra *E.canis*. ya que esto favorece que el paciente pueda recibir tratamiento durante fase aguda o subclínica, con respuesta positiva, y evitar así que se desarrolle la fase crónica.
2. Todos los perros con *E. canis* deben de recibir tratamiento, ya que la Ehrlichiosis es una enfermedad mortal y altamente contagiosa.
3. Para el control de la Ehrlichiosis es necesario realizar un control sobre la población de garrapatas en el perro y en el área donde vive el perro.

IX. RESUMEN

El objetivo del estudio fue generar información sobre la presencia de Ehrliquiosis Monocítica Canina en el municipio de Fraijanes, Guatemala. El vector de dicha enfermedad es la garrapata marrón del perro (*R. sanguineus*). Esta enfermedad puede presentar tres fases; la fase subclínica, aguda y crónica.

El estudio consistió en el muestreo de 30 perros pertenecientes al municipio de Fraijanes, con historia de garrapatoxis, atendidos en una clínica veterinaria en el período comprendido entre Diciembre 2011 Febrero 2012. Utilicé el kit comercial canine 4DX® de laboratorio IDEXX, el cual se basa en una prueba serológica ELISA indirecta. El resultado positivo del kit indica que el paciente estuvo expuesto a *E. canis*. Con la realización del presente estudio se demostró la presencia de anticuerpos contra *E. canis* en dos perros del municipio.

Para determinar la asociación que existía entre la presencia de anticuerpos contra *E. canis* y edad, raza, sexo, presencia o ausencia de signos y lugar donde vivía el perro utilicé la prueba de Chi cuadrado de independencia. Con lo que determiné que no hay asociación entre la presencia de anticuerpos contra *E. canis* y ninguna de las variables antes descritas.

SUMMARY

The main purpose of this study was to generate information of the presence of canine monocytic ehrlichiosis in Fraijanes, Guatemala. The vector of this disease is known as the dog's brown tick (*R. sanguineus*). This specific disease may present itself in three different forms: subclinical, acute or chronic.

This study used a sampling which consisted of 30 dogs that reside in Fraijanes, Guatemala and that had history of tick infestation. The dogs were sampled in a veterinary clinic between December 2011 and February 2012. I used the commercial kit 4DX® that belongs to the IDEXX laboratory; it is based on an indirect Elisa serologic test. A positive result indicates that the patient has been exposed to *E. canis*. The final result showed that two out of the thirty dogs had *E. canis* antibodies present.

To determine the association between the presence of *E. canis* antibodies and age, race, sex, presence or absence of clinical signs and the area where the dog lived I used the independence chi squared test. This led to the conclusion that there is no association whatsoever between the presence of *E. canis* antibodies and all of the previously mentioned variables.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaíno, H *et al.* 1990. Archivos de Medicina Veterinaria, XXII No. 2: Ecología del *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae) en la Región Metropolitana de Chile (Chile) 159 – 168.
2. Baneth, G. 2006. IP - Infectious & parasitic diseases: canine ehrlichiosis – a silent killer. 31st World Small Animal Veterinary Congress(República Checa) 479-483.
3. Bélanger, M. *et al.* 2002. Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infections in Dogs. Journal of Clinical Microbiology, September 2002, Vol. 40, No. 9. p. 3506-3508.
4. Birchard, SJ; Sherding, RG. 2002. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2 ed. Madrid, ES, McGraw Hill. 1857p.
5. Cárdenas, A. *et al.* 2007. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Conserved Immunoreactive Glycoproteins gp36 and gp19 Has Enhanced Sensitivity and Provides Species-Specific Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection. Clinical and vaccine immunology, Feb. 2007, p. 123–128.
6. Chandrashekar, R. *et al.* 2010. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. American Journal of Veterinary Research December 2010, Vol. 71, No. 12, Pages 1443-1450.
7. Cohn L.A. Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin North Am. Small Anim Pract. 2003; 33:863-884.
8. Cupp, E.W. Biology of ticks: Tick-transmitted diseases. Vet Clin North Am. Small Anim Pract. 1991; 21(1):1-26
9. El Manual Merck de Veterinaria. 2008. 6 ed. España. Océano. 2682 p.
10. Ewing, S.A; Roberson, W.R.; Buckner, R.G., and Hayat, C.S. A new strain of *Ehrlichia canis*. J Am Vet Med Assoc. 1971; 159(12):1771-1774.

11. Fisher, M; McGarry, J. 2006. Fundamentos de Parasitología en Animales de Compañía. Alemania. Intermedica S.A. 137p.
12. García, F. *et al.* 2005. Inmunoglobulinas (en línea). Consultado 26 de oct. 2011. Disponible en: http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas_nuevos_pdf/tema03.pdf
13. Harrus, S.; Alleman, A.R., and Bark, H.. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol.* 2002; 86(4):361-368.
14. Hoogstraal, H. Tickborne diseases of humans: a history of environmental and epidemiological changes. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Symposium Proceedings; 1977.
15. Idexx Laboratories. 2008. (a) Test uses ELISA technology (en línea). Consultado 10 sep 2011. Disponible en: <http://www.idexx.com/animalhealth/testkits/3dx/technology.jsp>
16. _____. (b) 2011. Test Snap 4Dx Canino (en línea). Consultado 2 sep. 2011. Disponible en: http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/smalanimal/inhouse/snap/4dx.jsf
17. Kidd, L; Breitschwerdt, E.B. Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compendium.* 2003; 25(10):742-751.
18. Kirk, R; Bonagura, J. 1999. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales.* Pensilvania, EEUU. McGraw-Hill Interamericana. 1638 p.
19. Kujman, S. *et al.* 2005. Universidad del Centro Prov. Buenos Aires, Argentina. Hemoparásitos transmitidos por garrapatas. Consultado 29 oct. del 2011. Disponible en <http://www.veterinariosenweb.com/revista/capitulo-13/nota2.html>
20. Lorente, M. 2004. Evaluación hematológica e inmunofenotípica se la “*Ehrlichiosis canina*”: evolución tras la administración de “dipropionato de Imidocarb”. Madrid. 307p.

21. Mc Quiston, J. *et al.* 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Med Today: Zoonosis Update*. JAVMA, Vol 223, No. 12, December 15, 2003. 1750 – 1756.
Charn, B. *et al.* 2003. UC Davis School of Veterinary Medicine. *Viral and Bacterial Zoonoses of the Dog*. 40p.
22. Mehlhorn, H; Duwell, D; *et al.* 1994. *Manual de Parasitología Veterinaria*. Colombia. Grass-Iatros. 284p.
23. Parola, P. and Raoult, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* . 2001; 33 (5):749.
24. Pena, J. Cabello, A. 2005. *Introducción a la Inmunología* (en línea). Consultado 26 de oct. 2011. Disponible en: http://www.uco.es/grupos/inmunologiaolecular/temas_nuevos_pdf/tema01.pdf
25. Pérez, M.; Rikihisa, Y., and Wen, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2133-2139.
26. Ristic, M., Williams, J.C. and Kakoma, I. *Current strategies in research on ehrlichiosis*. Ehrlichiosis. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.; 1990; pp. 138-153.
27. Rojas, E. 2001. (a) *Las garrapatas IV* (en línea). Consultado 6 sep. 2011. Disponible en: <http://www.webveterinaria.com/merial/Garrapatasiv.pdf>
28. _____. 2001. (b) *Las garrapatas II* (en línea). Consultado 6 sep. 2011. Disponible en <http://www.webveterinaria.com/merial/GarrapataII.pdf>
29. Sánchez Vizcaíno, JM. 2004. *Curso de introducción a la inmunología porcina*. Elisa. (en línea). Consultado 27 oct. 2011. Disponible en <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>
30. Sauer, J.R.; Mane, S.D., and Smichmidt, S.P. *Molecular basis for salivary fluid secretion in ixodid ticks*. In Sauer, J.R, Hair J.A (Eds): *Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks*. Chichester, England, Ellis Horwood. 1986

31. Tatchell, R.J. The ionic regulatory role of the salivary secretions of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Journal of Inse Ct Physiology*. 1969; 15:1421
32. Tizar, I. 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8va. ed. Elsevier. España. 574p.
33. Unver, A.; Perez, M.; Orellana, N.; Huang, H., and Rkihisa, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(8):2788-2793.
34. Vásquez, R. *et al.* 1999. *Parasitología veterinaria*. Madrid, ES., McGraw-Hill-Interamericana. p. 711-713
35. Waner, T; Harrus S. 2000. *Recent advances in canine infectious diseases: Canine monocytic ehrlichiosis* (New York, USA).
36. Weisiger, R.M.; Ristic, M., and Huxsoll, D.L. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by indirect fluorescent antibody method. *Am J Vet Res*. 1975; 36(5):689-694.

XI. ANEXOS

11.1 Encuestas para muestreo

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Escuela de Medicina Veterinaria

“Determinación de la presencia de anticuerpos circulantes contra *Ehrlichia canis* en perros con historia de garrapatoxis atendidos en una clínica veterinaria del municipio de Fraijanes, Guatemala, en el período comprendido entre Diciembre 2011 – Febrero 2012”

Fecha: _____ día _____ mes _____ año

No. De Muestra: _____

Datos de la Mascota:

- Nombre: _____
- Raza: _____ Sexo: M
- Edad: _____ Color: _____ Peso: _____
- Temperatura _____ Condición corporal 1. 2 3 4 5
- FC ____ppm FR _____rpm Llenado capilar _____
- Coloración de mucosas _____

Anamnesis:

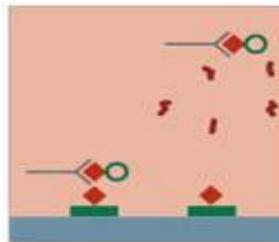
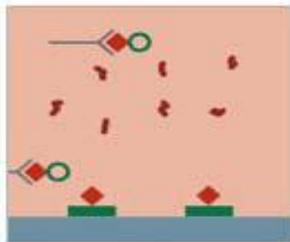
- ¿Ha padecido de garrapatoxis? Sí No
- ¿Hace cuanto observo garrapatas en su perro? _____
- ¿Dónde se mantiene su perro?
 - Dentro de casa
 - Fuera de casa
 - En ambos lados
- ¿Su mascota ha presentado anorexia, debilidad o decaimiento?
 - Sí No Otros _____

11.2 Diagrama de resultado de kit 4DX canine IDEXX

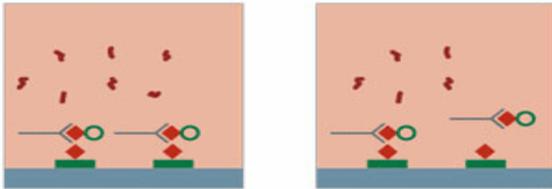


Sample and Conjugate

La muestra y el conjugado son combinados en el tubo de muestra. El conjugado contiene el antígeno con la enzima específica adherida a él. La matriz es presembrada con anticuerpos específicos del antígeno.

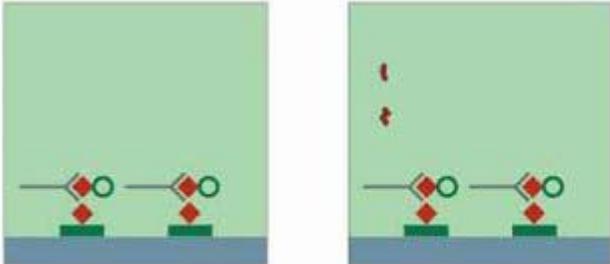


When SNAP device is activated, three distinct events occur:



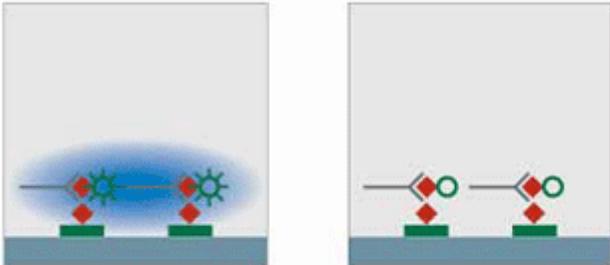
The diagram shows two stages of the Snap step. In the first stage, red Y-shaped antigens are in the air above a blue matrix containing green antibody conjugates. In the second stage, the antigens have bound to the antibodies on the matrix. To the right, a SNAP device is shown with a red arrow pointing to the test strip, labeled "Snap".

El antígeno y el conjugado se unen en la matriz ligada de anticuerpo activando el dispositivo.



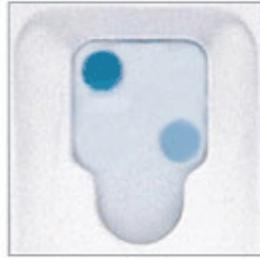
The diagram shows two stages of the Wash step. In the first stage, the matrix has the antibody-antigen complex. In the second stage, a green liquid is being poured over the matrix, washing away unbound antigens and antibodies. To the right, a SNAP device is shown with a green arrow pointing to the test strip, labeled "Wash".

La fase de lavado remueve los componentes no ligados y no específicos del conjugado y la muestra de sangre del fondo de la matriz para el paso final.



The diagram shows two stages of the Substrate step. In the first stage, a blue substrate is being applied to the matrix, reacting with the bound antibodies to produce a blue color. In the second stage, the substrate has reacted, and the color is visible. To the right, a SNAP device is shown with a blue arrow pointing to the test strip, labeled "Substrate".

El sustrato se mueve a través de la matriz limpia y este reacciona con el conjugado para amplificar la presencia del antígeno para incrementar la sensibilidad y eliminar errores, la lectura es de color azul, la cual varía en su intensidad desde muy suave a fuerte.



La reacción
dorma un punto
azul que se
vizualiza en la
ventana de
resultado para su
posterior lectura

ESQUEMA DE POSIBLES RESULTADOS

1.



Positivo a EMC

2.



Negativo a EMC

3.



Resultado invalido