

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**



***Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp. en sangre y ectoparásitos de caninos que visitan áreas recreativas de Costa Rica**

**Tesis para optar por el título de
Licenciatura en Medicina Veterinaria
Reconocida con la distinción "SUMMA CUM LAUDE"**

Autor: Alexander Barrantes González

Tutora: Ph.D. Gaby Dolz Wiedner

**Lectores:
Ph.D. Juan José Romero Zúñiga
Ph.D. Ana Eugenia Jiménez Rocha**

Costa Rica, marzo del 2014

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Ph.D. Gaby Dolz Wiedner
Tutora

Ph.D. Juan José Romero Zúñiga
Lector

Ph.D. Ana Jiménez Rocha
Lectora

DEDICATORIA

A mi madre Gilda González, mi padre Carlos Barrantes, mis hermanas Paola, Karla y Fabiola, mi sobrinita Valeria, mis sobrinitos Esteban y Alfonso.

A mi tutora Gaby Dolz, mis lectores Juan José Romero y Ana Jiménez.

A Mauricio Jiménez y todas mis compañeras y compañeros del Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

A Sue Hellen Gamboa, María Fernanda Posada, Carmen Sauter, Ann Kathrin Wüst, Marta Bonilla, Antony Solórzano, Víctor Montenegro, María Isabel Di Mare, Ruperto Quesada, Cristina Sáenz, Rosemary Huertas, Laura Bouza, Andrés Villalobos, Katherine Pacheco, Adriana Troyo y Liz Taylor.

A Diana Vargas, Lisa Fonseca, Karen Vega, Miguel Araya, Leonel Altamirano, Raquel Vega, Adriano Wang, Manuel Cervantes y Vanessa Robles.

A Grettel Soto, Santiago Sarceño, Melissa González, Skady Pfiffer, Elizabeth Herrera, Fernando Restrepo y Mayela Castro.

A Juan Bautista Castro E.

...porque no fueron granitos, ni mucho menos de arena; han sido el aliento, el impulso vital, el apoyo, el aporte, que le dieron valor y le otorgaron sentido a este humilde esfuerzo.

Alexánder Barrantes González.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi familia.

A mi tutora y lectores.

Al Consejo Nacional de Rectores.

A mi Jefe y compañeras y compañeros de trabajo del Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

A mis amigos y mis amigas.

A mis compañeras y compañeros de estudio, a lo largo de la carrera.

A los estudiantes voluntarios que colaboraron con el proyecto.

Al equipo de compañeras y compañeros del área de laboratorios de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

Al todo el personal técnico y administrativo que participó en la realización de esta investigación de la Universidad Nacional, la Universidad de Costa Rica, el Instituto Tecnológico de Costa Rica, la Universidad Estatal a Distancia, el Instituto Costarricense del Deporte, el Club de Leones y las Municipalidades de los parques públicos visitados.

A los dueños de las perros que constituyeron la población objeto de este estudio.

A los directores y servidores de los parques públicos visitados.

A las mascotas estudiadas.

...porque cada una de sus tan diversas aportaciones, hizo algo más que una simple sumatoria y deja este trabajo como un pequeño testimonio de lo que es capaz de hacer el amor, la amistad, el trabajo en equipo, el compromiso, la cooperación, el acompañamiento, la inspiración y la voluntad, cuando se confabulan con complicidad absoluta en una misma causa.

Alexánder Barrantes González.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XIV
ABSTRACT	XVI
RESUMEN	XVIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ecología y epidemiología	1
1.2. Etiología	4
1.2.1. <i>Ehrlichia</i>	4
1.2.2. <i>Rickettsia</i>	5
1.3. Transmisión	7
1.3.1. <i>Ehrlichia</i>	7
1.3.2. <i>Rickettsia</i>	8
1.4. Patogénesis.....	10
1.4.1. <i>Ehrlichia</i>	11
1.4.2. <i>Rickettsia</i>	16
1.5. Manifestaciones clínicas.....	19
1.5.1. <i>Ehrlichiosis</i>	19
1.5.2. <i>Rickettsiosis</i>	20
1.6. Diagnóstico.....	21
1.7. Tratamiento y profilaxis	25
1.8. Justificación e importancia.....	26
1.9. Hipótesis.....	29
1.10. Objetivos.....	30
1.10.1. <i>Objetivo general</i>	30

1.10.2. <i>Objetivos específicos</i>	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. Diseño del estudio y tamaño de la muestra	31
2.2. Población analizada	32
2.3. Entrevista y ficha clínica	32
2.4. Toma, transporte y manejo de las muestras	33
2.5. Análisis clínicos y frotis sanguíneo	34
2.6. Identificación de los ectoparásitos	35
2.7. Diagnóstico serológico.....	36
2.8. Diagnóstico molecular.....	37
2.9. Análisis de los datos	39
3. RESULTADOS	41
3.1. Características de la población analizada	41
3.2. Entrevista.....	43
3.3. Examen objetivo particular.....	44
3.4. Análisis clínicos y frotis sanguíneo	46
3.5. Ectoparásitos	48
3.6. <i>Ehrlichia canis</i>	51
3.6.1. <i>Análisis estadístico</i>	55
3.7. <i>Rickettsia spp.</i>	61
3.7.1. <i>Análisis estadístico</i>	64
3.8. Análisis estadístico de la seropositividad mixta	70
4. DISCUSIÓN	77
4.1. Ectoparásitos	77
4.2. <i>Ehrlichia canis</i>	80

4.3. <i>Rickettsia</i> spp.	87
4.4. Seropositividad mixta	93
4.5. Sobre la metodología de investigación.....	94
5. CONCLUSIONES	96
6. RECOMENDACIONES	99
7. LISTA DE REFERENCIAS.....	101
8. ANEXOS	122

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Técnicas diagnósticas más utilizadas en el diagnóstico de infecciones rickettsiales.....	25
Cuadro 2. Valores hematológicos internacionales de referencia en perros.....	35
Cuadro 3. Número de perros analizados en cada parque, según su origen por provincia y cantón.....	42
Cuadro 4. Descripción de la población canina muestreada en quince parques recreativos.....	43
Cuadro 5. Resultados de las entrevistas sobre convivencia, presencia y control de ectoparásitos y frecuencia de visitas de los perros a los parques recreativos.....	45
Cuadro 6. Resultados de las entrevistas sobre historia clínica de los perros muestreados.....	46
Cuadro 7. Resultados del examen objetivo particular y del grado de infestación con ectoparásitos realizado a los perros en estudio.....	47
Cuadro 8. Valores hematológicos y negativos en todas las pruebas aplicadas a la población total de perros.....	47

Cuadro 9. Distribución de garrapatas, según sexo y estadio, encontradas en los perros en estudio	48
Cuadro 10. Distribución de pulgas, según sexo, encontradas en los perros en estudio	49
Cuadro 11. Distribución geográfica de las garrapatas y las pulgas encontradas en los perros en estudio, según la ubicación geográfica de los parques recreativos.....	49
Cuadro 12. Porcentajes de infestación por especie de garrapatas y pulgas, según la ubicación geográfica de los parques recreativos	50
Cuadro 13. Resultados de IFI e ICM para detectar anticuerpos contra <i>E. canis</i> en los sueros caninos	51
Cuadro 14. Comparación de los resultados obtenidos con IFI e ICM para detectar anticuerpos contra <i>E. canis</i> en los sueros caninos	51
Cuadro 15. Seroprevalencia de <i>E. canis</i> por provincias y parques.....	52
Cuadro 16. Resultados de la PCR para <i>E. canis</i> en sangre y garrapatas	53
Cuadro 17. Resultados de la PCR en sangre y garrapatas para <i>E.</i> <i>canis</i> , según la ubicación geográfica del parque	54

Cuadro 18. Secuenciación de una porción del gen 16S RNA de <i>E. canis</i> detectado en las muestras positivas de sangre canina y garrapatas <i>R. sanguineus</i>	54
Cuadro 19. Análisis de los valores hematológicos en perros seropositivos y seronegativos a <i>E. canis</i> mediante la prueba de t-student	56
Cuadro 20. Análisis de los factores de riesgo en los perros seropositivos a <i>E. canis</i> , mediante regresión de Poisson.....	57
Cuadro 21. Análisis de los valores hematológicos en los perros PCR positivos y negativos a <i>E. canis</i> , mediante la prueba de t-student	57
Cuadro 22. Análisis de los factores de riesgo en los perros PCR positivos a <i>E. canis</i> , mediante regresión logística	58
Cuadro 23. Análisis de los factores de riesgo en los perros con garrapatas PCR positivas a <i>E. canis</i> , mediante regresión logística	59
Cuadro 24. Análisis de valores hematológicos en los perros según los resultados obtenidos en las pruebas serológicas y moleculares a <i>E. canis</i> , mediante la prueba de t-student	60
Cuadro 25. Resultados de la IFI para <i>Rickettsia</i> spp.	61

Cuadro 26. Seroprevalencia de <i>Rickettsia</i> spp. por provincias y parques	62
Cuadro 27. Detección de <i>Rickettsia</i> spp. mediante PCR, en las garrapatas y pulgas recolectadas en los perros en estudio	63
Cuadro 28. Distribución de las garrapatas y pulgas detectadas positivas a <i>Rickettsia</i> spp. mediante PCR, según la ubicación geográfica de los parques	64
Cuadro 29. Análisis de valores hematológicos en perros seropositivos y seronegativos a <i>Rickettsia</i> spp. mediante la prueba de t-student	65
Cuadro 30. Análisis de los factores de riesgo en perros seropositivos a <i>Rickettsia</i> spp. mediante regresión de Poisson	67
Cuadro 31. Análisis de los valores hematológicos en los perros seropositivos y seronegativos en IFI a <i>R. amblyommii</i> mediante la prueba de t-student.....	68
Cuadro 32. Análisis de los valores hematológicos en los perros seropositivos y seronegativos a <i>Rickettsia</i> (R.i.) mediante la prueba de t-student	68

Cuadro 33. Análisis de los factores de riesgo en los perros seropositivos a <i>Rickettsia</i> (R.i.) mediante regresión de Poisson	69
Cuadro 34. Análisis de los valores hematológicos en los perros seropositivos a <i>R. rickettsii</i> , <i>R. amblyommii</i> y <i>Rickettsia</i> (R.i.) mediante la prueba de t-student.....	72
Cuadro 35. Análisis de los factores de riesgo en los perros con garrapatas y pulgas PCR positivas a <i>Rickettsia</i> spp. mediante regresión de Poisson.....	73
Cuadro 36. Análisis de valores hematológicos en seropositividad mixta de <i>Rickettsia</i> spp. y <i>E. canis</i> mediante la prueba de t-student según los resultados serológicos	74
Cuadro 37. Análisis de valores hematológicos en seropositividad mixta de <i>R. amblyommii</i> y <i>E. canis</i> mediante la prueba de t-student según los resultados serológicos	75
Cuadro 38. Análisis de valores hematológicos en seropositividad mixta de <i>Rickettsia</i> (R.i.) y <i>E. canis</i> mediante la prueba de t-student según los resultados serológicos	76

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Área de cobertura del muestreo Círculos: sitios de muestreo Zonas en amarillo: cantones de origen de los perros muestreados..... 41
- Figura 2.** Alineamiento de la secuencia de *E. canis* obtenida de un perro (secuencia *E. canis* _C286 16S rRNA) y la secuencia del GenBank (*E. canis* Jake 16S rRNA). En rojo se muestran los nucleótidos que no se alinearon con la secuencia del GenBank..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

\propto : En una relación directamente proporcional al riesgo

16S rARN: Gen 16S ARN ribosomal

ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine

ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (células citotóxicas dependientes de anticuerpos)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CIBCM: Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular

CMHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

DE: Desviación estándar

DES: Diferencia estadísticamente significativa

DOT-ELISA: Dot-enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas sobre membranas de microcelulosa)

DPI: Días post inoculación

ECM: Ehrlichiosis monocítica canina

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria

EOP: Examen objetivo particular

GAM: Gran Área Metropolitana

***gltA*:** Gen citrato sintetasa

ICM: Inmunocromatografía de membrana

IC_{95%}: Intervalo de confianza 95%

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN- γ : Interferon gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-2: Interleucina 2

LI: Límite inferior

LS: Límite superior

MIF: Microinmunofluorescencia

msnm: Metros sobre el nivel del mar

N: Número de individuos

NK: Natural Killer

P: Probabilidad

PI: Persistentemente infectado

P de Wald: Probabilidad según prueba de Wald

PCR: Polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PMIF: Platelet migration inhibition factor (factor de migración e inhibidor de plaquetas)

rARN: Ácido ribonucleico ribosomal

***Rickettsia* (R.i.):** Especies de *Rickettsia* indefinidas

SRD: Sin raza definida

TBE: Tris-Borato-EDTA

UCR: Universidad de Costa Rica

UNA: Universidad Nacional

ABSTRACT

This research constitutes the first transversal study that combines various diagnostic techniques, such as Membrane Immunochromatography (MIC), Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), Polymerase Chain Reaction (PCR) and molecular sequencing to detect different *Ehrlichia* species circulating in 441 dogs and their ectoparasites that visited recreational parks in different socioeconomic regions of Costa Rica. A seroprevalence of 32,1% (131/408), PCR prevalence of 3,2% (13/407), and percentage of 6,9% (9/130) PCR positive ticks for *E. canis* was determined. A past infection with *E. canis* was established in 29,7% (121/407) of the dogs, whereas only 2,5% (10/407) and 0,7% (3/407) of the dogs showed a persistent and acute infection, respectively. Significant hemopathological findings were determined in all clinical stages of ehrlichiosis: persistent infection (anemia and leucopenia), past infection (anemia, thrombocytopenia, lymphopenia and monocytopenia) and acute infection (thrombocytosis and lymphopenia). Furthermore, the following risk factors were associated with *E. canis* seropositivity: age (∞), depressive attitude, delayed capillary refill time, canine population index (∞), tick infestation index higher than 3,1; while the pure breed was determined as a protective factor. Risk factors associated with *E. canis* PCR-positive dogs were: depressive attitude, very pale mucous membranes, fever, dog population index (1-2) and tick infestation index higher than 2,1, whereas risk factors associated with dogs with *E. canis* PCR-positive ticks were: delayed capillary refill time, that vet had suspected ehrlichiosis and that the dog received treatment for suspected ehrlichiosis.

Additionally, analysis of hematological values and risk factors of *Rickettsia* seropositive dogs, and *Rickettsia* PCR-positive tick and flea dogs was carried out. Significant hemopathological findings related to *Rickettsia* spp. seropositivity were leucopenia (eosinopenia and lymphopenia), those related to not defined *Rickettsia* species (R.i) seropositivity were anemia, thrombocytopenia and leucopenia, and that related to *R. amblyommii* seropositivity was polycythemia. The following risk factors were associated to *Rickettsia* spp. seropositivity: age (∞), scrotal edema, anorexia, dog size (∞), staying outside the home, tick infestation index (∞) and flea infestation index higher than 2,1, while the pure bred and male sex were established as protective factors. Risk factors associated with *Rickettsia* (R.i) seropositivity were: age (∞), pale mucous membranes, anorexia, bleeding, medium dog size, staying outside the home, presence of more than four people living with the dog, tick infestation index (∞) and flea infestation index higher than 2,1; while male sex and pure bred were determined as protective factors. The risk factor associated with dogs with *Rickettsia* spp. PCR-positive ticks was pure bred dogs, whereas the protective factor was having been treated against flea infestation. Finally, risk factors associated with dogs with *Rickettsia* spp. PCR-positive fleas were pure bred dogs and quantity of people living with the dog (∞), whereas protective factors were male sex, staying outside the home and stray dogs. No risk factors were determined for *R. amblyommii* nor *R. rickettsii* seropositivity.

RESUMEN

Esta investigación constituye el primer estudio transversal que combina las técnicas diagnósticas de la Inmunocromatografía de Membrana (ICM), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación molecular, para la detección de diferentes especies de *Ehrlichia* circulantes en 441 perros y sus ectoparásitos, que visitaron parques recreativos distribuidos en todas las regiones socioeconómicas de Costa Rica. Se determinó, para *E. canis*, una seroprevalencia de 32,1% (131/408), una prevalencia del 3,2% (13/407) y un porcentaje de garrapatas PCR positivas del 6,9% (9/130). Además, se estableció un 29,7% (121/407) de perros con infección pasada, un 2,5% (10/407) con infección persistente y un 0,7% (3/407) con infección aguda. Se establecieron hallazgos hemopatológicos significativos en las diferentes fases clínicas de la ehrlichiosis, en la infección persistente (anemia y leucopenia), en la infección pasada (anemia, trombocitopenia, linfopenia y monocitopenia) y en la infección aguda (trombocitosis y linfopenia). Además, se asociaron los siguientes factores de riesgo con seropositividad a *E. canis*: la edad (∞), actitud depresiva, llenado capilar lento, índice poblacional canino (∞), índices mayores a 3,1 de infestación con garrapatas; mientras que la raza pura se determinó como un factor protector. Los factores de riesgo asociados a perros PCR positivos fueron: actitud depresiva, membranas mucosas muy pálidas, fiebre, índice poblacional canino (1-2) e índices mayores a 2,1 de infestación con garrapatas; y los factores de riesgo asociados a perros con garrapatas PCR positivas fueron: llenado capilar lento, sospecha del veterinario de ehrlichiosis y administración de un tratamiento fundamentado en dicha sospecha.

Además, se realizó el análisis de los valores hematológicos y factores de riesgo de perros seropositivos y garrapatas PCR positivas a *Rickettsia* spp. Se determinó que los hallazgos hemopatológicos relacionados a seropositividad a *Rickettsia* spp. fueron: leucocitopenia (eosinopenia y linfopenia); los relacionados a seropositividad a especies de *Rickettsia* indefinidas (R.i.) fueron: anemia, trombocitopenia y leucopenia; y el relacionado a seropositividad a *R. amblyommii* fue la policitemia. Se establecieron como factores de riesgo asociados a seropositividad a *Rickettsia* spp. los siguientes: edad (∞), edema escrotal, anorexia, talla (∞), permanencia fuera del hogar, índice de infestación con garrapatas (∞) e índices mayores a 2,1 de infestación con pulgas; mientras que el sexo macho y la raza pura se establecieron como factores protectivos; factores de riesgo asociados a seropositividad a *Rickettsia* (R.i): edad (∞), membranas mucosas pálidas, anorexia, sangrados, talla mediana, permanencia fuera del hogar, presencia de más de cuatro personas viviendo con el perro, diagnóstico de ehrlichiosis, altos índices de infestación con garrapatas (∞) e índices mayores a 2,1 de infestación con pulgas; mientras que el sexo macho y la raza pura se establecieron como factores protectivos. Como factor de riesgo asociado a perros con garrapatas PCR positivas a *Rickettsia* spp. se identificó la raza pura y como factor protectorio el haber sido tratado contra infestación de pulgas. Finalmente, los factores de riesgo asociados a perros con pulgas PCR positivas a *Rickettsia* spp. fueron: la raza pura y cantidad de personas viviendo con el perro (∞) y los factores protectivos fueron: el sexo macho, la permanencia fuera del hogar y el estatus de deambulación de los perros. No se establecieron factores de riesgo asociados a seropositividad con *R. amblyommii* y *R. rickettsii*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ecología y epidemiología

Ehrlichia canis fue inicialmente identificada en perros por Donetein y Lestoquard en Algeria en 1935 (Lestoquard y Donetein 1936). Sin embargo, la enfermedad concentró mayor interés luego de que un gran número de perros militares susceptibles de raza pastor alemán, murieron durante la guerra de Vietnam (Keefe et al. 1982). *E. canis* recibió más atención a finales de los años ochenta, cuando se sospechó que infectaba humanos. En perros, se ha establecido una elevada morbilidad y mortalidad (Greene 2012).

Su distribución es mundial, con presencia en cuatro continentes (Greene 2012). En Australia, no se ha detectado ADN de *E. canis* hasta la fecha (Mason et al. 2001; Barker et al. 2012), mientras que, en Argentina se detectó recientemente (Eiras et al. 2013).

En 1991, se encontró que *Ehrlichia chaffeensis* era la causa de la ehrlichiosis monocitotrópica en humanos (Anderson et al. 1991); antes de 1986, el único agente ehrlichial asociado a humanos era *Neorickettsia sennetsu* (Greene 2012) y, hasta la fecha, se ha detectado ADN de *E. chaffeensis* en sangre periférica de venados en Brasil, Korea y Japón (Kawara et al. 2006; Lee et al. 2009), de coyotes y en perros en Estados Unidos (Dawson et al. 1996; Kocan et al. 2000).

Desde 1970, se reporta la ehrlichiosis granulocítica en perros, sin distinguir entre *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum* (Greene 2012). En 1971, se consideró a *E. ewingii* como una variante de *E. canis* (Ewing et al. 1971). En 1992, fue confirmada genéticamente como el agente causante de la ehrlichiosis granulocítica canina (Anderson et al. 1992). *E. ewingii* ha sido reportada, hasta la fecha, en los Estados Unidos, Brasil y Camerún (Goodman et al. 2003; Greene 2012).

En Costa Rica, *E. canis* fue reportada en perros, por primera vez, por Meneses (1995). Desde el 2005, en Costa Rica, se han registrado brotes de ehrlichiosis en seres humanos (Hernández- de Mezerville y Padilla-Cuadra 2007; Solano y Villalobos 2007; Brenes et al. 2011).

Rímolo (2008) encontró un 70% de positividad de *E. canis*, mediante una prueba comercial (Snap 3Dx Idexx) en una población de caninos sospechosos. En los últimos años, gracias al empleo de técnicas moleculares, se identificó *E. canis* en sangre de individuos enfermos (48%) y en las garrapatas de dichos animales (26%). Asimismo, se determinó la ausencia de *E. chaffeensis* y *E. ewingii* en sangre y garrapatas de perros en el Valle Central (Ábrego 2008; Romero 2008). Scorza et al. (2011) reportan la identificación, por medio de una prueba comercial de ELISA, de anticuerpos contra *E. canis* en el 3,5% de las muestras de una población canina en San Isidro de El General. Recientemente, se reportaron nuevos hallazgos sobre la distribución de las garrapatas en el territorio costarricense, así como la identificación de *E. canis* en garrapatas recolectadas en ambiente, sobre perros y caballos (Atenas, Puriscal, Puntarenas, Guápiles, Turrialba y San Carlos) y la presencia de *E. chaffeensis* y *E. canis* en venados, en todo el territorio costarricense (Soto 2010). Estos datos se encuentran en proceso de confirmación a través de la secuenciación de las muestras. Recientemente, Rojas et al. (2014) detectaron un 34% de positividad a *E. canis* en perros de Costa Rica.

La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas se describió en Idaho en 1873, en un caso humano (Milstone y Dumler 2009). Fue reconocida, en los Estados Unidos, antes de 1930, cuando Howard Taylor Ricketts pudo transmitir la bacteria de pacientes humanos a cobayos y monos (Parola et al. 2005). Ha sido reportada en el continente americano en Canadá, México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Argentina y Brasil (Greene 2012).

Tres factores asociados a la elevada prevalencia de este agente son: los bosques deciduos, los altos niveles de humedad y las temperaturas cálidas. El género *Rickettsia* tiene una distribución mundial (Greene 2012).

En Costa Rica, se reportaron los primeros casos de rickettsiosis por medio de serología en 1952 y en 1971 (Nuñez et al. 1952; Peacock et al. 1971), y en 1974, se reportó un aparente primer brote en Limón (Campbell et al. 1974). En 1975, se logró la visualización directa de las bacterias, en casos en San Carlos y se determinó *Rickettsia rickettsii*, a través de inmunofluorescencia indirecta (Fuentes 1979).

Los siguientes hallazgos se hicieron en 1980 y 1982 en Puerto Limón y en Guápiles, respectivamente (Fuentes et al. 1985; Hun et al. 1991).

Además de las investigaciones que se realizaron en ectoparásitos (*Haemaphysalis leporispalustris*), se determinó una virulencia mayor que la cepa de los Estados Unidos en cobayos (Fuentes et al. 1985).

En el 2008, se comprobó, mediante PCR, que al menos un 36% de garrapatas y pulgas, resultaron positivas para alguna especie de *Rickettsia*, en zonas donde han sido reportados contagios humanos con anterioridad, como Guápiles, Cahuita, San Carlos y Turrialba (datos no publicados), y se identificó *Rickettsia amblyommii* en *Amblyomma cajennense* y *Rickettsia felis* en *Ctenocephalides felis* (Hun et al. 2008).

Se han realizado caracterizaciones moleculares de otras especies de rickettsias en Centroamérica (Bermúdez et al. 2011; Hun et al. 2011) y se ha determinado que puede existir serocruce entre *R. rickettsii* y *R. amblyommii* (Hun et al. 2011).

La información sobre perros data de 1986, cuando un 62% fueron seropositivos a la cepa Sheila Smith (Fuentes 1986). A partir del 2010, se han efectuado estudios que establecieron un

21,4% y un 27,5% de positividad contra *R. rickettsii* y *R. amblyommii* respectivamente, según datos no publicados (Hun 2013).

Informes complementarios al presente estudio (Pacheco 2013), determinaron una seropositividad a *Rickettsia* spp. del 14%, siendo *R. amblyommii* y *R. rickettsii*, las especies de rickettsias vinculadas a la reacción inmunológica. Además, un 30,0% de garrapatas y un 32,3% de pulgas, analizadas por medio de PCR, resultaron positivas.

1.2. Etiología

Las rickettsias están clasificadas en la clase Alphaproteobacteria, dentro del orden Rickettsiales. El género *Ehrlichia* se encuentra incluido en la familia Anaplasmataceae, mientras que el género *Rickettsia* dentro la familia Rickettsiaceae (Greene 2012).

1.2.1. Ehrlichia

La ehrlichiosis es causada por bacterias intracelulares que pertenecen al orden de los Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, género *Ehrlichia* (Dumler et al. 2001). Este género se compone de bacterias gramnegativas intracelulares obligadas que infectan principalmente leucocitos, tales como monocitos, macrófagos y granulocitos (Walker 1996) y se han encontrado históricamente en garrapatas y mamíferos. Estas bacterias son cocobacilos ácidosensibles que carecen de vía glucolítica, altamente pleomórficas y de un tamaño promedio de 0,5 μm (Greene 2012).

La ehrlichiosis canina monocitotrópica (ECM) es causada por el organismo intracelular obligado *E. canis* (Weiss y Wardrop 2010; Greene 2012). Esta bacteria aparece dentro del

citoplasma de los linfocitos, monocitos y macrófagos en grupos de organismos llamados mórulas (Milonakis et al. 2003; Greene 2012).

E. ewingii es el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica (Anderson et al. 1992; Greene 2012). Esta bacteria crece en forma de mórulas granulocíticas y nunca ha sido cultivada *in vitro* (Greene 2012).

E. chaffeensis es el agente causante de la ehrlichiosis monocítica humana. Infecta cánidos y su presencia se ha demostrado en varias especies de garrapatas y animales vertebrados en muchos países (Greene 2012).

1.2.2. *Rickettsia*

Las rickettsias son bacterias clasificadas en el orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae, género *Rickettsia*. La familia Rickettsiaceae, se compone de dos géneros: *Orientia* y *Rickettsia*. Los miembros del género *Rickettsia* se dividen en los pertenecientes al grupo de las Fiebres Manchadas y al grupo Tifus (Greene 2012).

Al igual que las ehrlichias, son gramnegativas, pleomórficas e intracelulares obligadas, que se han encontrado principalmente en garrapatas, pulgas, piojos, ácaros y mamíferos (Heymann 1996; Walker 1996). Una combinación de características fenotípicas y genotípicas, ayudan a la clasificación taxonómica de *Rickettsia*, aunque los criterios para la determinación de los grupos y las especies todavía están en desarrollo. Se ha propuesto la creación de un grupo transicional según criterios genotípicos (Fournier y Raoult 2009; Greene 2012). Tienen gran relevancia, debido a que son causantes de enfermedades emergentes en todo el mundo.

Las garrapatas son vectores para el grupo de las Fiebres Manchadas con excepción de *Rickettsia akari* (ácaros) y *Rickettsia felis* (pulgas). Se conocen más de veinte miembros en el

grupo de las Fiebres Manchadas. Estos organismos son difíciles de cultivar y de estudiar en el laboratorio por ser bacterias intracelulares y de carácter endoteliotrópico. Es difícil diferenciar las bacterias por su fenotipo y clínica. El alto serocruce entre los miembros del grupo de las Fiebres Manchadas dificulta además, la distinción entre especies (Greene 2012).

A las rickettsiosis del grupo de las Fiebres Manchadas se les considera enfermedades reemergentes (Paddock 2009); los cambios ecológicos han influido en su comportamiento cíclico (Walker et al. 2008). Lo anterior es importante porque existe una gran incertidumbre con respecto a la virulencia de cepas emergentes y reemergentes (Walker et al. 2008).

R. rickettsii es el agente etiológico de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas y la mayoría de las rickettsiosis en el hemisferio oeste son causadas por ella, mientras que en Europa, por *Rickettsia conorii* (Greene 2012); ocasionan enfermedad tanto en el humano (Walker 1996; Milstone y Dumler 2009) como en el perro (Demma et al. 2006).

R. amblyommii también corresponde a este grupo, presente en el hemisferio occidental. Se ha confirmado que tiene una alta prevalencia con elevados títulos, pero su patogenicidad en perros no ha sido demostrada hasta la fecha. Esto es importante debido a que ocurren reacciones cruzadas por su estrecha relación antigénica con *R. rickettsii*, lo que puede confundir el diagnóstico serológico (Paddock 2009; Walker et al. 2008).

R. felis también pertenece al grupo de las Fiebres Manchadas aunque, originalmente, fue denominada Fiebre Manchada similar al Tifus Murino. Se conoce que la pulga mantiene la bacteria en el ambiente y que es patógena para el ser humano (Pérez-Osorio et al. 2008).

Avances en la biología molecular han permitido el reconocimiento y la caracterización de nuevas especies de rickettsias que habían sido consideradas no patógenas. Aunque algunas no

están caracterizadas, es muy posible que más especies puedan causar enfermedad en perros (Greene 2012).

1.3. Transmisión

1.3.1. Ehrlichia

Los hospedadores vertebrados para *E. canis* incluyen miembros de la familia Canidae. El coyote, zorro y chacal, además de los perros domésticos, son considerados hospedadores reservorios. También, se ha sugerido que *E. canis* puede infectar a los gatos (Breitschwerdt, 2002).

El artrópodo vector de *E. canis* es la garrapata café del perro o *Rhipicephalus sanguineus* (Bremer et al. 2005). Esta garrapata tiene un ciclo de vida de un solo hospedador, se alimenta de la sangre del perro en los tres estadios de su ciclo de vida y puede mantenerse dentro de los hogares en ambientes domésticos (Johnson et al. 1998).

Experimentalmente, la infección ha sido también transmitida por *Dermacentor variabilis* (Johnson et al. 1998), pero esta garrapata no ha sido reportada aún en Costa Rica (Álvarez et al. 2005).

La infección avanza a los estadios subsecuentes de la garrapata de forma transestadial, pero no de manera transovarial. Las garrapatas adquieren *E. canis* ya sea como larvas o como ninfas, al alimentarse de sujetos infectados y transmitiendo la infección a los perros susceptibles, al menos, durante los siguientes 155 días (Groves et al. 1975).

No se ha determinado aún, el tiempo mínimo requerido de unión de la garrapata al sujeto, para infectarlo (Kidd y Breitschwerdt 2003). Muchos casos ocurren en el período del año

con mayor cantidad de garrapatas; sin embargo, la enfermedad puede ocurrir en cualquier otra época, en caninos con infección crónica o subclínica (Greene 2102).

E. canis no depende, para su sobrevivencia, de la transmisión hacia otros animales. Pueden persistir dentro del individuo durante meses o años; eso sí, convierten a sus hospedadores en reservorios, ya que las garrapatas que se alimentan de ellos, pueden infectarse y constituirse en transmisoras (Greene 2012).

Amblyomma americanum, garrapata que no ha sido registrada en Costa Rica, hasta la fecha (Álvarez et al. 2005), es el único vector competente comprobado para *E. ewingii* (Anziani et al. 1990; Ewing et al. 1995) aunque se ha identificado ADN de *E. ewingii* tanto en *D. variabilis* (Murphy et al. 1998; Ijdo et al. 2000) como en *R. sanguineus* (Greene 2012). El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) sirve como reservorio (Greene 2012).

E. chaffeensis es transmitida por *A. americanum* y también por *D. variabilis* (Ewing et al. 1995). También, ADN de *E. chaffeensis* ha sido detectado en garrapatas *R. sanguineus* recolectadas en perros de Camerún (Ndip et al. 2010). El venado cola blanca, los perros y otros carnívoros sirven como hospedadores reservorios. Los perros pueden ser portadores de *E. chaffeensis* en zonas geográficas endémicas. Se ha detectado reacción serológica en mapaches (*Procyon lotor*), zarigüeyas (*Didelphis virginianus*) y ratones (*Peromyscus leucopus*) en Norteamérica (Greene 2012).

1.3.2. *Rickettsia*

En los Estados Unidos, se ha implicado a dos garrapatas (*Dermacentor andersoni* y *D. variabilis*) como hospedadores naturales, reservorios y vectores de *R. rickettsii*. *R. sanguineus* también ha sido implicada en áreas no endémicas como Canadá, México y Suramérica. *R.*

sanguineus y *Amblyomma cajennense* son las dos garrapatas mayormente implicadas en la transmisión de *R. rickettsii* en México, Centroamérica y Suramérica. Aunque se ha demostrado la seropositividad para *R. rickettsii* en perros de Brasil, no se encontró evidencia molecular. Las garrapatas del género *Ixodes* se alimentan una vez durante cada estadio, por lo tanto, si lo hacen sobre varios hospedadores, pueden transmitir, de manera exitosa, la infección a nuevos mamíferos (McDade y Newhouse, 1986; Guedes et al. 2005; Greene 2012).

Las garrapatas se infectan de dos maneras: a través de la ingesta de sangre de pequeños mamíferos con suficiente rickettsemia durante la infección aguda. Este ciclo silvestre primario, mantiene la transmisión de rickettsias en la naturaleza y ocurre entre pequeños mamíferos y estadios inmaduros de las garrapatas. Es posible que otros mamíferos, de mediano tamaño, también actúen como fuente de infección para las garrapatas. Las aves representan un medio de transporte para las garrapatas infectadas (Greene 2012).

Otro mecanismo es la transmisión transestadial y transovarial; incluso puede ocurrir transmisión venérea de *R. rickettsii* cuando las garrapatas adultas copulan. Sin embargo, las hembras que son infectadas de esta manera, no son capaces de transmitirla transováricamente (Greene 2012). En cada estadio (larva, ninfa y adulto) se alimenta, generalmente, de un nuevo hospedero, transfiriendo, de este modo, a su prole, agentes infecciosos (Parola y Raoult, 2001; Ahantarig et al. 2008).

R. rickettsii inicia su réplica en las células epiteliales del intestino de la garrapata, ingresa en la hemolinfa y se disemina al resto de los tejidos, incluyendo las glándulas salivales y los ovarios. Las garrapatas deben ingerir las bacterias en un elevado número para lograr la transmisión ovarial. Este se considera el medio principal por el que *R. rickettsii* se mantiene en la naturaleza (Greene 2012).

La baja prevalencia de infección en las garrapatas (menos del 2%), en áreas con alta prevalencia de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, sugiere que en los hospedadores como los perros, es raro el desarrollo de una rickettsemia suficientemente alta como para infectar a un elevado número de garrapatas, lo que podría explicar, también, por qué esta enfermedad se limita a ciertas zonas geográficas (Greene 2012).

La infección rickettsial en las garrapatas no es una relación simbiótica, ya que puede afectar su reproducción y hasta generarles la muerte. Se ha reportado además, que puede desarrollarse resistencia a *R. rickettsii* en las garrapatas y posiblemente en los mamíferos hospedadores, como resultado de la infección con otras especies no patógenas. Es necesario un periodo de alimentación largo, para que ocurra una replicación continua del agente en las glándulas salivales de la garrapata. Las infecciones rickettsiales que se producen por picadura de garrapatas requieren de un periodo de adhesión extendido; esto no ocurre cuando las membranas mucosas entran en contacto con las bacterias en heces, hemolinfa, cultivos de laboratorio o sangre (Greene 2012).

1.4. Patogénesis

La patogenicidad de las bacterias intracelulares se asocia con la respuesta inmune que se desarrolla frente a ellas. La capacidad para eliminar a estas bacterias reside fundamentalmente en la acción de mecanismos de base celular, más que en los anticuerpos. Al encontrarse en el interior de la célula hospedadora, dejan de ser susceptibles a los mecanismos microbicidas de la fagocitosis y la infección debe controlarse por otros medios. Las citoquinas producidas por los linfocitos T (Interferon gamma (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2)) activan a los macrófagos. El macrófago muestra aumento de la quimiotaxis, mayor número de pseudópodos y gránulos, mayor

eficacia microbicida por incremento de los compuestos reactivos de nitrógeno y aumento de la secreción de citoquinas y expresión de moléculas del CMHC II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad II). Además, depende de la acción de mecanismos específicos de citotoxicidad sobre células infectadas, como por ejemplo, la activación de los macrófagos linfocitos T CD4+ y la acción de los linfocitos T CD8+, que actúan de forma conjunta contra las bacterias intracelulares (Gómez-Lucía et al. 2007).

Durante las fases iniciales de la invasión y el tránsito hacia nuevas células, las bacterias son potenciales dianas de la acción mediada por inmunoglobulinas, que pueden destruirlas directamente o bloquear la invasión de nuevas células. Asimismo, intervienen en el reconocimiento de antígenos bacterianos expresados en la superficie de las células infectadas, participando en los fenómenos de Células Citotóxicas Dependientes de Anticuerpos o ADCC, por sus siglas en inglés, en células con receptores para anticuerpos como Aseinas Naturales o NK, por sus siglas en inglés, monocitos y neutrófilos (Gómez-Lucía et al. 2007).

1.4.1. Ehrlichia

El periodo de incubación de *E. canis* es de 8 a 20 días. Las bacterias se multiplican en los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear por fisión binaria (Mullen y Durden 2002; Milonakis et al. 2003; Thomas et al. 2010) y se distribuyen por todo el cuerpo. Se cree que la infección es pasada entre las células a través de proyecciones citoplasmáticas (Thomas et al. 2010).

La replicación en el hospedador toma lugar en vacuolas unidas por membranas, protegidas del sistema de vigilancia inmune, lisosomas e intermediarios oxígeno reactivos. Se ha identificado un mecanismo de adaptación, que les permite residir dentro de estas vacuolas y comunicarse con

la célula hospedadora a través del retículo endoplásmico. Este mecanismo se encuentra dentro de un grupo de genes que codifican proteínas que median interacciones proteína-proteína (Mavromatis et al. 2006). Las anquirinas también afectan la expresión de citoquinas proinflamatorias y la supresión de los reguladores del ciclo de la célula. Las ehrlichias pueden ser liberadas e infectar nuevas células por medio de la ruptura de la membrana celular en un estado tardío de la formación morular (Thomas et al. 2010).

Al periodo de incubación le siguen tres fases: aguda, subclínica y crónica. La fase aguda puede durar de una a cuatro semanas. La mayoría de los perros se recupera de la enfermedad aguda con un adecuado tratamiento. Los perros no tratados o mal tratados, pueden recuperarse clínicamente, pero también es posible que entren en una fase subclínica, donde sólo el conteo plaquetario pueda ser anormal (Waner et al. 1997, Harrus et al. 1998a). Los perros en esta fase permanecen como portadores clínicamente sanos por meses o años (Harrus et al. 1998a). Resultados experimentales indican que las bacterias se encuentran en el bazo durante la fase subclínica, último órgano en eliminar las bacterias (Faria et al. 2010). Por consiguiente, esta estructura juega un papel importante en la patogénesis y en la resultante expresión clínica de la enfermedad. Los perros esplenectomizados han demostrado tener una enfermedad más leve comparados con los que conservan el bazo (Harrus et al. 1998b).

Los sujetos persistentemente infectados (PI) pueden recuperarse de la enfermedad espontáneamente o desarrollar la enfermedad crónica severa. No todos los animales progresan hasta la fase crónica, y las condiciones que llevan al desarrollo de esta etapa aún no están claros (Siarkou et al. 2007). Suele ocurrir pancitopenia severa, debido a hipoplasia medular. Se presenta un conteo menor de hematocrito, leucocitos y trombocitos, que puede llevar a la pérdida de la vida (Greene 2012). Leucopenia y anemia severas, tiempos parciales prolongados de activación de la

tromboplastina e hipocalcemia, predicen la muerte con una probabilidad del 100% (Shipov et al. 2008). El deceso suele ocurrir como consecuencia de hemorragias e infecciones secundarias (Greene 2012).

En las infecciones severas agudas puede haber vasculitis y trombocitopenia, coagulación intravascular, leucopenia y anemia no regenerativa moderada (Mullen y Durden 2002; Hirsh et al. 2004; Gyles et al. 2010).

Los hallazgos hematológicos dependen de la fase de la infección (Weiss y Wardrop 2010) y están asociados con la inflamación y los procesos inmunológicos desencadenados por la infección (Waner et al. 1995; Harrus et al. 1996a; Harrus et al. 1999). La infección aguda está asociada con trombocitopenia severa y anemia no regenerativa. La leucopenia y la neutropenia son menos consistentes. La trombocitopenia puede ser inmunomediada y no inmunomediada (Waner et al. 2000).

Después de la infección aguda, se desarrolla una fase subclínica, donde la anemia normalmente se resuelve, pero la trombocitopenia se presenta de modo persistente. Los perros que llegan a desarrollar una fase crónica severa, muestran pancitopenia profunda. La médula ósea en la fase aguda es típicamente hiper celular. Un incremento de la razón de las líneas mieloide/eritroide ha sido descrito de tres a cuatro semanas postinfección en estudios experimentales (Reardon y Pierce 1981). Una elevación de los megacariocitos, una semana postinfección, refleja la respuesta hematopoyética a una trombocitopenia persistente (Waner et al. 1995). Se hallaron anticuerpos “antiplaquetas” y anticuerpos “de unión de plaquetas” en pacientes en la fase aguda. Los anticuerpos “antiplaquetas” compiten por los receptores de unión de las plaquetas. También, se ha encontrado citoquinas, Factor de Migración e Inhibidor de plaquetas (PMIF, por sus siglas en inglés), en perros con ehrlichiosis y sus niveles están inversamente relacionados al conteo de

plaquetas; de hecho, se ha establecido que los perros con niveles más altos de PMIF tienen cepas más virulentas de *E. canis* (Harrus et al. 1999).

La ehrlichiosis crónica produce pancitopenia secundaria, debido a una severa hipocelularidad de la médula ósea (Buhles et al. 1974; Stockman y Scott 2008). Los aspirados de médula ósea tienen muy pocas células con un número bajo de células estromales, fibroblastos y macrófagos; los precursores hematopoyéticos son pocos o nulos. Las biopsias muestran una médula ósea poco celular llena de tejido adiposo. También, ha sido reportada mastocitosis en la fase crónica y plasmocitosis de la médula ósea independientemente de la fase. *E. canis* puede causar anemia aplásica, aunque no es tan frecuente (Weiss y Wardrop 2010). A pesar del fallo de la médula y la pancitopenia, no ocurre mielofibrosis. La trombocitopenia puede ser también acompañada por disfunción de las plaquetas. Esta disfunción, en conjunto con el bajo conteo de plaquetas, contribuye a las hemorragias (Harrus et al. 1996a; Harrus et al. 1996b).

La mayoría de los perros con *E. canis* desarrollan hiperproteinemia debido al desarrollo de una hipergammaglobulinemia. El papel de los anticuerpos en la eliminación de la infección es mínimo; altos títulos no proveen protección, por el contrario, tienen un efecto negativo en la progresión de la enfermedad (Ristic y Holland 1993; Barnwell 1999). Los perros con gammapatía monoclonal son susceptibles de desarrollar hiperviscosidad con signos clínicos asociados como hemorragia subretinal y desprendimiento de retina (Greene 2012).

Los anticuerpos de tipo IgG generalmente aparecen quince días postinfección. La reacción de los anticuerpos IgG2 es la principal en todas las fases de la enfermedad (Harrus et al. 2002). Se cree que el cambio al isotipo IgG2 está asociado con una respuesta tipo 1 de los linfocitos T colaboradores y su correspondiente producción de INF- γ . Aparentemente, la inmunidad inducida por las células T y la secreción de INF- γ juegan un importante papel en la recuperación de las

infecciones (Waner et al. 2001).

Los pastores alemanes son más susceptibles a manifestar la enfermedad que otras razas, con un curso más severo y una tasa de mortalidad mucho más alta. Se cree que esto se debe a que la respuesta inmunológica celular, en estos perros, está más disminuida, mientras que la humoral se mantiene igual en infecciones con *E. canis* (Nyindo et al. 1980).

E. canis logra evadir el sistema inmune del hospedador a través de constantes alteraciones en la superficie de los antígenos y mediante la expresión de diversas variantes protéicas, ocasionando su persistencia. Dentro de los mecanismos de evasión inmune también están, la disminución de los receptores clase 2 del CMHC (Harrus et al. 2002) y un incremento de la habilidad de inhibir la función fagosoma-lisosoma, lo que favorece la supervivencia y multiplicación de este agente (Greene 2012).

E. ewingii invade granulocitos, formando colonias intracitoplasmáticas conocidas como mórulas (Hirsh et al. 2004; Greene 2012). Estas mórulas pueden ser detectadas dentro de los granulocitos doce días postinfección, mientras que los signos clínicos inician de 18 a 28 días postinfección (Greene 2012).

Las células predilectas para la replicación de *E. ewingii* son los neutrófilos, que persisten en la circulación periférica, normalmente de seis a ocho horas. La infección provoca una demora en la apoptosis de estas células por un lapso de hasta cinco días. La resolución de este cuadro clínico resulta en la normalización del periodo de sobrevivencia de los neutrófilos. La inmunosupresión puede exacerbar la infección. La enfermedad clínica ocurre en perros con alguna condición inmunosupresora. La patogénesis se desconoce aún; se cree que un componente inmunomediado puede ser responsable de la poliartritis y la destrucción de plaquetas (Greene

2012). La poliartritis neutrofílica es la causa de la cojera (Mullen y Durden 2002; Gyles et al. 2010).

E. chaffeensis carece de enzimas para la biosíntesis de peptidoglicanos y lipopolisacáridos que proveen fuerza a la membrana externa. La ausencia de estos lipopolisacáridos y peptidoglicanos tiene importantes implicaciones en la infección y supervivencia de estas bacterias, tanto en las garrapatas como en los mamíferos. El sistema inmune es competente en la respuesta a lipopolisacáridos, y por lo tanto, la ausencia de estos les da el beneficio de supervivencia (Greene 2012).

E. chaffeensis causa un efecto citopático y necrosis en la mayoría de las células infectadas *in vitro*, además de necrosis en pacientes inmunocomprometidos. Experimentalmente, se ha podido observar trombocitopenia, fiebre, vómito, epistaxis, linfadenomegalia y uveítis (Gyles et al. 2010).

Tanto los perros como los humanos, pueden infectarse con *E. canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*. Aunque las personas no pueden adquirir ehrlichiosis por manejo con perros infectados, los animales sí pueden ser reservorios para estos agentes y podrían jugar un papel en la transmisión, llevando los vectores a los humanos (Nelson y Couto 2009).

1.4.2. *Rickettsia*

Las rickettsias son diseminadas por medio del sistema circulatorio; invaden y se replican en las células endoteliales de las arteriolas y vénulas (Maxie 2007; Bowman 2009; Gyles et al. 2010; Greene 2012) de todo el cuerpo, particularmente en los pulmones, el cerebro, el hígado, los riñones, el corazón, el bazo y la piel (Gyles et al. 2010). El periodo de incubación es de 2 a 14

días. Las fosfolipasas y proteasas de las bacterias actúan sobre las membranas celulares (Greene 2012).

El daño que producen en las células endoteliales resulta en vasculitis (Maxie 2007; Bowman 2009; Gyles et al. 2010) con activación plaquetaria y activación del sistema de coagulación, acompañado con una disminución de los niveles plasmáticos de antitrombina III y plasminógeno, y un incremento en la degradación de los productos de fibrinógeno; estos cambios hematológicos son consistentes con la activación simultánea de los sistemas fibrinolíticos y de coagulación. El consumo del factor de coagulación, usualmente, no es lo suficientemente alto para causar hipofibrinogenemia o una coagulación intravascular diseminada manifiesta. Los resultados del análisis de los factores de coagulación sugieren la activación, tanto de la vía extrínseca como de la vía intrínseca. Elevados niveles de anticuerpos asociados a plaquetas indican una relación causal con la trombocitopenia (Grindem et al. 1999); por lo anterior, se presume que sobreviene la hemorragia. También se registra edema, perfusión inadecuada, trombosis y disnea (Hirsh et al. 2004).

La vasculitis es un producto de la necrosis endotelial, con la contribución de las respuestas inmunes y fagocíticas del hospedador, pero no una respuesta primaria debida a la formación de complejos inmunes u otros mecanismos. La necrosis produce un aumento de la permeabilidad vascular, y por lo tanto, edema y hemorragia multifocal (Maxie 2007). Tanto los signos nerviosos como la muerte, se relacionan con depresión cardiorespiratoria causada por edema en los centros medulares. La vasculitis necrotizante progresiva puede ser ocasionada por activación secuencial del complemento, quimiotaxis celular y subsecuente necrosis vascular con extravasación de sangre, mientras que el consumo de plaquetas es un potencial coadyuvante de la trombocitopenia.

Los órganos con circulación endoarterial pueden verse más afectados por la trombosis (Greene 2012).

Las enfermedades rickettsiales serían causa de trombocitopenia inmunomediada secundaria, especialmente en zonas endémicas. La patogénesis de esta trombocitopenia es complicada y poco entendida, pues comprende: supresión de la producción de plaquetas, distribución anómala, consumo incrementado y destrucción inmunomediada (Grindem et al. 1999).

Los perros, aunque es poco frecuente, pueden desarrollar una alta y persistente rickettsemia, representando un peligro potencial para la salud pública (Maxie 2007). Las personas no adquieren rickettsiosis por el manejo de perros infectados, sin embargo estos animales pueden ser reservorios para estos agentes y transmitir los vectores a los humanos (Nelson y Couto 2009).

La infección fulminante puede resultar en colapso vascular periférico y muerte en la primera semana de postinfección. Después de una infección natural y recuperación de la enfermedad, *R. rickettsii* es eliminada del organismo y se establece una respuesta inmune protectora, que en infecciones experimentales se ha determinado que puede durar hasta 3 años. (Greene 2012). Las razas puras parecen ser más propensas a desarrollar la enfermedad que las razas mixtas, y el pastor alemán es el más susceptible por sus deficiencias en la respuesta celular descritas anteriormente. El springer spaniel inglés es propenso a desarrollar deficiencia de fosfofructoquinasa, por lo que presenta un curso de enfermedad más fulminante; estos perros son más propensos a desarrollar necrosis cutánea y tardar más en responder al tratamiento (Weiser y Greene 1989).

1.5. Manifestaciones clínicas

1.5.1. Ehrlichiosis

La ehrlichiosis es un desorden multisistémico (Greene 2012). Se pueden observar signos como anorexia, depresión, pérdida de peso por emaciación, tendencia a la hemorragia por trombocitopenia, además de fiebre, membranas mucosas pálidas, epistaxis, petequias, equimosis, linfadenomegalia, linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia, conjuntivitis, edema en varios tejidos del cuerpo y ascitis (Mullen y Durden 2002; Castro et al. 2004; Gyles et al. 2010; Greene 2012).

Los perros pueden mostrar cambios en el color o apariencia de los ojos, producto de una paraproteinemia, hipertensión sistémica, hifema, sangrados subretinales y desprendimiento de la retina. Otros hallazgos son uveitis, corioretinitis, papiledema, hemorragia retinal e infiltrados perivasculares retinales. Las manifestaciones nerviosas (convulsiones, estupor, ataxia, disfunción vestibular, anisocoria, disfunción cerebelar, temores intencionales, hiperestesia) son principalmente producto de meningitis o sangrados meningeales, o ambos, y daño del tejido adyacente al sistema nervioso central o periférico. La ehrlichiosis puede ser causal de daño miocárdico, pues se ha visto un aumento en los niveles de troponina 1 en perros con infección aguda (Greene 2012).

La enfermedad clínica con *E. ewingii* es considerablemente más leve que la ocasionada por *E. canis* (Greig et al. 1996); la ausencia de reportes de mortalidad sugiere lo anterior (Greene 2012). Para *E. ewingii*, las manifestaciones clínicas más importantes son la fiebre y la cojera; otros incluyen letargia, anorexia, signos nerviosos (temores, anisocoria, inclinación de la cabeza) y rara vez hemorragias, pérdida de peso, organomegalia, uveitis, prurito, vómito y diarrea (Mullen y Durden 2002; Gyles et al. 2010; Weiss y Wardrop 2010; Greene 2012).

Los signos clínicos más característicos de *E. chaffeensis* son la fiebre, anorexia y trombocitopenia, además de uveítis anterior, vómito, epistaxis, eritema multiforme y linfadenomegalia, sin embargo, los síntomas son leves o moderados (Dawson et al. 1992; Dawson et al. 1996; Greene 2012), aunque también se han reportado manifestaciones severas (Breitschwerdt et al. 1998).

Los perros con afectación inmunológica resultante de la ehrlichiosis, pueden ser infectados de manera secundaria con otro tipo de agentes oportunistas (Greene 2012).

1.5.2. *Rickettsiosis*

La infección con *R. rickettsii* causa una enfermedad febril que puede llegar a ser severa en algunos casos (Bowman 2009), la fiebre es uno de los síntomas más consistentes y se da entre los dos y tres días posteriores a la adhesión de la garrapata (Greene 2012).

En perros infectados con *R. rickettsii*, la enfermedad cursa en dos fases, clínica y subclínica (Greene 2012). Los signos clínicos usuales son: apatía, fiebre, depresión, anorexia, linfadenomegalia, edema subcutáneo de la cara y extremidades, mialgia, artralgia, petequias en las membranas mucosas y piel, epistaxis, melena, hematuria, signos neurológicos focales, necrosis de las extremidades y muerte por diátesis hemorrágica, fallo de órganos vitales o colapso vascular y choque, hiperemia de los labios, prepucio, pina, extremidades y abdomen ventral, además de déficit vestibular, hiperestesia paralumbar, vómito y diarrea (Maxie 2007; Gyles et al. 2010).

Se han observado vesículas y pápulas en la mucosa oral. Los machos que desarrollan edema escrotal o hinchazón epididimal pueden presentar renuencia a caminar, mostrando una marcha rígida; las anomalías en la marcha también pueden ser producto de la inflamación del sistema apendicular así como de meningitis. Las petequias y equimosis pueden desarrollarse

después de la enfermedad aguda, y ser más visibles en las mucosas oculares, orales y genitales. Las epistaxis, melena y hematuria son detectadas en casos de animales severamente afectados.

Los pacientes corren el riesgo de morir rápidamente de una meningoencefalitis progresiva (Maxie 2007) que pasaría a encefalomielitis (Greene 2012). El edema de la médula oblongada puede generar depresión cardiorrespiratoria (Maxie 2007). Los signos neurológicos focales (como signos vestibulares) son comunes en las fases iniciales de la enfermedad. Después de una a dos semanas del inicio de los signos clínicos en animales severamente afectados, es posible que ocurra un daño orgánico permanente, resultado de disfunción neurológica residual (Greene 2012).

El deceso sobrevendría durante la fase aguda por diátesis hemorrágica o trombosis de los órganos vitales, daño cardiovascular, neurológico y renal. En los estados terminales se puede observar choque, colapso cardiovascular y oliguria (Greene 2012).

1.6. Diagnóstico

El diagnóstico de las enfermedades rickettsiales está basado en una combinación de anamnesis, signos clínicos, anormalidades hematológicas, hallazgos histopatológicos, hallazgos serológicos, cultivo celular y PCR (Nicholson et al. 2010; Greene 2012).

La citología es una de las herramientas usadas para demostrar la presencia de mórulas en frotis sanguíneos o en macrófagos de aspirados de bazo, pulmón y linfonodos. También, se visualiza dentro de los monocitos del líquido sinovial o líquido cefaloraquídeo. Las mórulas son difíciles de encontrar en los frotis sanguíneos, es una tarea que demanda mucho tiempo. Las mórulas de *E. canis* son posibles de observar como mórulas de forma redondeada, de múltiples tamaños y con apariencia granular punteada. Pueden ser vistas en los linfocitos, monocitos o macrófagos. Dentro de las células mononucleares, los organismos se multiplican por fisión binaria

en una vacuola citoplasmática. La parasitemia en sangre periférica es baja y transitoria después de la infección inicial (Weiss y Wardrop 2010). La detección de las mórulas se hace más probable si se toman aspirados de bazo, que de la capa leucocitaria de las sangre periférica de la oreja (Greene 2012).

Las mórulas de *E. ewingii* se encuentran con preferencia en los neutrófilos y escasamente en los eosinófilos, similares en apariencia a aquellas de *E. canis*, aunque aparecen más empaquetadas y menos punteadas. Los organismos pueden ser vistos, de manera transitoria, durante la fase aguda, ya que la parasitemia es lo suficientemente alta como para ser detectada por microscopia. También, son susceptibles de ser identificados en el fluido sinovial en perros con poliartritis (Weiss y Wardrop 2010). La evaluación de los cuerpos de inclusión o mórulas, en frotis sanguíneos, posee desventajas, ya que es una prueba poco sensible debido a que necesita una alta cantidad de bacterias circulantes en sangre (Iqbal et al. 1994; Walker 1996; Harrus et al. 1998a), en ocasiones se encuentran inclusiones no relacionadas con *Ehrlichia* que pueden causar confusión en el diagnóstico (Beaufils et al. 1995; Mylonakis et al. 2003); además, no es posible diferenciar entre las especies de *E. canis* y *E. chaffeensis*, por presentar una morfología idéntica y poseer tropismo por las mismas células (Dumler et al. 2001).

Las técnicas serológicas diagnostican el contacto con los agentes. El diagnóstico serológico para la ehrlichiosis incluye técnicas inmunoenzimáticas como ELISA, entre ellas, Inmunocromatografía de Membrana (ICM) y técnicas inmunofluorescentes. Para *Rickettsia*, el diagnóstico serológico se basa en la técnica de la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Esta técnica fue desarrollada en 1972 y es considerada “estándar de oro”, pues los anticuerpos (IgM o IgG) son detectables de siete a diez días después del establecimiento de la enfermedad (Kostman 1996; Silber 1996; Dantas-Torres 2007).

Todas las técnicas serológicas anteriores no distinguen entre una infección activa, una infección pasada o una exposición sin establecimiento de infección (Iqbal et al. 1994; Dawson et al. 1996; Murphy et al. 1998); sin embargo, se ha establecido que la presencia de IgM o un incremento de cuatro veces en el título de IgG en muestras pareadas, es considerado como un indicador de infección activa, 15 días posteriores a la primera evaluación (Waner et al. 2001; Harrus et al. 2002, Greene 2012).

Para la interpretación de los resultados, es necesario tomar en cuenta la historia, signos clínicos y hallazgos de laboratorio. Lo anterior sirve para detectar falsos negativos, debido al retraso en la formación de anticuerpos durante la fase inicial de la enfermedad (Dawson et al. 1992; Dawson et al. 1996; Standadaert et al. 2000). Los títulos de IgG en infecciones activas, normalmente disminuyen después de tres a cinco meses, pero pueden permanecer elevados (>128) por más de diez meses (Greene 2012). En el caso de *E. canis* y *E. chaffeensis*, los anticuerpos son detectables dos a tres semanas postinfección, dependiendo de la cantidad de agente al que haya sido expuesto el animal (Rikihisa et al. 1992).

Para el género *Ehrlichia*, se reporta serocruce con otros miembros dentro de este género (Dumler et al. 2001) e incluso con los géneros *Anaplasma* y *Neorickettsia* (Greene 2012). En el caso de *R. rickettsii*, se ha descrito serocruce con otros miembros del grupo de las Fiebres Manchadas. La técnica de la IFI no ha sido estandarizada internacionalmente, por lo tanto, hay variaciones en los protocolos entre laboratorios. El hallazgo de títulos de anticuerpos IgG contra *E. canis* mayores o iguales a 1/40 o 1/80 indica exposición presente al agente, según sea el laboratorio; para *Rickettsia* un título de 1/64 se considera específico en zonas endémicas. Después del tratamiento, los títulos tienden a bajar y subsecuentemente, a desaparecer; sin embargo, los títulos pueden permanecer elevados hasta 31 meses después de iniciado el tratamiento. No existe

serocruce entre *E. canis* y *R. rickettsii*. Por las similitudes entre los síntomas clínicos de estas dos enfermedades, aquellos pacientes seronegativos deben ser analizados contra *R. rickettsii* (Greene 2012).

Para la detección de agentes infecciosos en tejidos y fluidos de garrapatas, se han utilizado técnicas como la observación directa del agente en hemolinfa de las garrapatas (Burgdorfer 1970) y técnicas de cultivo celular que permiten el aislamiento y replicación de la mayoría de los agentes infecciosos (Robertson y Wisseman 1973), y recientemente, la implementación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés. Con esta última, se logró amplificar y, por consiguiente, detectar material genético de los agentes en ectoparásitos y sangre (Higgins y Azad 1995; Parola y Raoult 2001).

Las técnicas moleculares demostraron tener una alta sensibilidad, especificidad y confiabilidad comparadas con otras técnicas tradicionales (Iqbal et al. 1994; Dawson et al 1996; Murphy et al 1998; Standaert et al. 2000). Además, se obtienen resultados en poco tiempo (uno a dos días) y se puede distinguir entre especies de bacterias. Por consiguiente, representan la primera elección para estudios de determinación y prevalencia de agentes infecciosos transmitidos por vectores (Brouqui et al. 2004). La técnica de la PCR convencional basada en la amplificación de regiones del gen *16S rARN* de *Ehrlichia*, ha demostrado efectividad en el diagnóstico del agente en muestras de sangre de humanos y perros, con un límite de detección de 0,2 pg utilizando la PCR anidada (Iqbal et al. 1994; Dawson et al. 1996; Wen et al. 1997). Se ha propuesto, que a mayor grado de trombocitopenia, mayor es la posibilidad de detección de *E. canis* en sangre los perros en zonas endémicas (Greene 2012). Las principales técnicas diagnósticas para estas dos enfermedades se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Técnicas diagnósticas más utilizadas en el diagnóstico de infecciones rickettsiales

Agente	Hospedador	Enfermedad	Técnicas diagnósticas
<i>Ehrlichia</i> spp.	Perros, gatos, humanos y otros animales domésticos	Ehrlichiosis	IFI ^a para anticuerpos en suero Frotis (Giemsa) de sangre o médula ósea PCR ^b en sangre completa Cultivo de las bacterias
<i>Rickettsia</i> spp.	Perros, gatos y humanos	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	IFI ^a para anticuerpos en suero PCR ^b en sangre completa Cultivo de las bacterias

Fuente: Greene (2012) con modificaciones

^a Inmunofluorescencia indirecta

^b Reacción en cadena de la polimerasa

1.7. Tratamiento y profilaxis

El tratamiento de las enfermedades rickettsiales consiste en la administración de antimicrobianos como las tetraciclinas y el cloranfenicol. Entre más temprano se inicie el tratamiento, más probabilidades de recuperación tiene el paciente. Los enfermos en la fase crónica de *E. canis*, no suelen responder al tratamiento debido al compromiso de muchos sistemas y la severa inmunosupresión. La doxiciclina es el antibiótico de elección, aunque otras tetraciclinas son efectivas. La doxiciclina tiene la ventaja de poseer una vida media mayor y logra penetrar al sistema nervioso central. Lo recomendado en el 2002, por el Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM, por sus siglas en inglés), es un tratamiento por un periodo de 28 días, con una dosis mínima de 10 mg/kg al día, para contrarrestar la enfermedad en la fase aguda. Se espera que haya mejoría en las veinticuatro a cuarenta y ocho horas siguientes y que los conteos plaquetarios empiecen a aumentar de diez a catorce días posteriores a la instauración del tratamiento (Greene 2012).

En contraste, en los casos de rickettsiosis, el tratamiento consiste en la administración de doxiciclina por siete días, a una dosis de 10 mg/kg al día. La eficiencia de las quinolonas como la enrofloxacin o trovafloxacin es mínima en casos de ehrlichiosis, no así en casos de rickettsiosis,

donde son efectivas. El uso de corticosteroides es beneficioso para los pacientes, ya que ayudan a revertir la trombocitopenia inmunomediada y el edema cerebral; sin embargo, su uso no es frecuente porque, por sí sola, la terapia antimicrobial es curativa. No se ha registrado reinfecciones en perros que han resuelto infecciones con *R. rickettsii* (Greene 2012).

No existen vacunas comerciales para estos agentes y la mejor manera de prevenirlas es evitar el contacto con los vectores; esto es, eliminar los ectoparásitos de los perros por medio de productos garrapaticidas y pulguicidas, además del control de ellos en el ambiente. Lo anterior puede ser logrado, en áreas endémicas, por medio del mantenimiento de estrictos controles de garrapatas y pulgas y el tratamiento con doxiciclina en todos los perros infectados. Todos los animales deben de ser examinados antes de entrar a lugares donde puedan fungir como reservorios de los agentes para otros perros (Greene 2012).

1.8. Justificación e importancia

A nivel mundial, las garrapatas, las pulgas y los piojos son motivo de estudio y análisis por ser ectoparásitos hematófagos obligados, posibilitando, como vectores, la transmisión de diferentes agentes infecciosos a sus hospederos vertebrados (Hirsh et al. 2004; Piesman y Eisen 2008).

Las garrapatas completan su ciclo de vida en uno, dos o tres hospedadores. Durante el pasaje de un estadio a otro, algunas cambian de hospedador y realizan varias tomas de sangre, lo que permite la transmisión de agentes infecciosos entre diferentes vertebrados. Además de la transmisión transestadial de agentes rickettsiales en garrapatas, se ha descrito la vía de transmisión transovarial (Da Silva Costa et al. 2011). Lo anterior, aunado a una alta tasa de reproducción de las garrapatas, incrementa la transmisión de los agentes (Shaw y Day 2005).

Algunos de los géneros de garrapatas de importancia para la salud humana y la medicina veterinaria, reportados en Centroamérica son: *R. sanguineus*, *Amblyomma ovale*, *A. cajennense*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma pecarium*, *Amblyomma oblongoguttatum* e *Ixodes boliviensis* (Hernández 1997; Álvarez 2003; Álvarez et al. 2006; Bermúdez y Miranda 2011).

R. sanguineus se encuentra sobre todo en ambientes hogareños o “domiciliada”, por preferir a los perros, es una garrapata de un huésped (Álvarez et al. 2005). *Amblyomma* es el género que presenta más especies en el país, son garrapatas de tres huéspedes. *A. cajennense* ha sido documentada en Costa Rica por Álvarez et al. (2003), quienes reportan mayor presencia de esta en las regiones con influencia del Pacífico y con estacionalidad de lluvias (Chorotega, Pacífico Central, Pacífico Central Occidental y Puriscal). También, se ha reportado en provincias como Alajuela, Limón, Guanacaste, Puntarenas y San José, en alturas desde los 4 a los 1300 msnm y se encuentra, por lo general, infestando ganado. *A. ovale* se ha hallado en Heredia, Limón, Puntarenas y San José en alturas desde los 5 a los 1161 msnm, en perros, caballos, humanos, roedores. *A. maculatum* se ha reportado en Alajuela, Limón, Puntarenas y San José, en alturas desde los 4 a los 1101 msnm, y en especies como bovinos, caballos y perros. *I. boliviensis* se ha registrado en Cartago, Guanacaste y Puntarenas, desde los 34 a los 1475 msnm, en especies como bovinos, perros, venados, pizotes y mapaches; también son garrapatas de tres huéspedes (Álvarez et al. 2005).

Las pulgas tienen, en contraste con las garrapatas, un hábito de alimentación promiscuo, esto es, la mayoría de las especies son de hospedador preferencial más que de hospedador específico y por lo tanto, tratan de alimentarse de cualquier animal que esté disponible. Para algunas especies de pulgas está descrita la transmisión transovarial (Shaw y Day 2005). *Ctenocephalides felis* y *Pulex simulans* son de importancia clínica en Centroamérica (Hernández 1997; Bermúdez y

Miranda 2011; Escobar et al. 2011), sin embargo, hasta la fecha, no se conoce su distribución con exactitud en Costa Rica. No obstante, Troyo et al. (2012), reportaron la presencia de *C. felis* y *P. simulans*, en la zona Atlántica costarricense. En Panamá, *C. felis* es la pulga más abundante encontrada en perros (Bermúdez y Miranda 2011; Escobar et al. 2011).

La sangre del hospedador es importante para la supervivencia y desarrollo de los piojos chupadores o Anoplura (Mullen y Durden 2002). Se considera que los piojos malófagos subsisten a expensas del pelo y residuos epidérmicos; sin embargo, se halló sangre en el sistema digestivo del 50% de *Trichodectes canis* y en el 84% de *Heterodoxus spiniger*, siendo estos considerados como consumidores facultativos de sangre (Georgi y Georgi 1994). La mayoría de las especies de piojos son de hospedador específico y la transferencia de un individuo a otro ocurre, normalmente, por contacto físico (Wall y Shearer 2001). Sin embargo, algunos piojos no están de manera permanente sobre su hospedador, como es el caso de *H. spiniger* (Durden y Musser 1994). *Linognathus setosus*, *T. canis* y *H. spiniger* son de importancia clínica en Centroamérica (Hernández 1997; Bermúdez y Miranda 2011). No existen datos precisos sobre la distribución de piojos en el país. No obstante, Troyo et al. (2012), reportaron la presencia de *T. canis* y *H. spiniger* en la zona Atlántica costarricense.

Algunas investigaciones han determinado que los cambios climáticos de los últimos años han alterado los rangos geográficos de distribución de varias especies de vectores, dando paso a la aparición de enfermedades en nuevas zonas geográficas (IOM 2003, 2008a,b, 2011). El patrón y la prevalencia de infección, ya sea local o global, cambia a través del tiempo por múltiples razones (Shaw y Day 2005). Por consiguiente, es importante continuar en Costa Rica, con el proceso de evaluación sobre las posibles alteraciones en lo referente a la distribución de especies de garrapatas, pulgas y piojos y la presencia de agentes transmitidos por estos. Las ehrlichias y las

rickettsias son bacterias intracelulares que poseen mecanismos patogénicos distintos, sin embargo, tienen signos clínicos muy similares, tanto que una enfermedad es diagnóstico diferencial de la otra.

Estas dos enfermedades son de importancia, tanto para la medicina veterinaria como para la medicina humana y es necesario estudiar los sitios de posible exposición de mascotas caninas y seres humanos a las garrapatas, pulgas y piojos. Se considera que las áreas recreativas del país representan puntos significativos de muestreo, pues se conjuntan grupos humanos y sus mascotas, de manera eventual, de muy distintas regiones y representan posibles sitios de exposición con agentes vectoriales. De esta manera, la información generada será útil en la estimación del riesgo de exposición de las mascotas y los seres humanos que visitan los parques públicos con fines recreativos. Los perros, eventualmente, pueden servir como centinelas en el caso de las enfermedades zoonóticas y el uso de las técnicas diagnósticas ayudará a la detección de agentes patógenos, mejorará el entendimiento de su distribución y optimizará la monitorización y la vigilancia epidemiológica de patógenos emergentes rickettsiales (Greene 2012).

1.9. Hipótesis

- H_{01} = No hay presencia de *Ehrlichia* spp. en la sangre de los caninos que visitan las zonas de estudio.
- H_{02} = No hay presencia de *Ehrlichia* spp. en las garrapatas, pulgas y piojos de los caninos que visitan las zonas de estudio.
- H_{03} = No hay un perfil epidemiológico que permite identificar animales positivos a *Ehrlichia* spp. o *Rickettsia* spp., sin realizar el diagnóstico de laboratorio.

1.10. Objetivos

1.10.1. Objetivo general

Determinar la presencia de *Ehrlichia* spp. en sangre y ectoparásitos de caninos que visitan las áreas recreativas del territorio nacional.

1.10.2. Objetivos específicos

- Identificar las especies, sexo y estadio de los ectoparásitos.
- Determinar la seroprevalencia de *Ehrlichia* spp.
- Determinar la presencia y el porcentaje de infección de *Ehrlichia* spp. en sangre de caninos que visitan parques recreativos, mediante la PCR convencional.
- Determinar la presencia y el porcentaje de infección de *Ehrlichia* spp. en garrapatas de caninos que visitan los parques recreativos, mediante la PCR convencional.
- Confirmar las especies de *Ehrlichia* spp. que se encuentren en la sangre y ectoparásitos de los perros, mediante secuenciación molecular.
- Determinar si existen hallazgos hemopatológicos que permitan identificar perros positivos a *E. canis* y *Rickettsia* spp., por medio del análisis de la prueba de t-student.
- Determinar los factores de riesgo asociados a positividad para *E. canis* y *Rickettsia* spp., por medio del análisis de regresión lineal y regresión de Poisson.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño del estudio y tamaño de la muestra

Se realizó un estudio observacional, transversal, de tipo descriptivo, para determinar la presencia de *Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp., mediante el análisis molecular y serológico, tanto de la sangre, como de los ectoparásitos de los perros que visitan los parques recreativos de Costa Rica.

El tamaño de la muestra total estimada para este estudio fue de 300 individuos, para encontrar un mínimo de 1% de prevalencia (95% confianza) de *Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp. en una población de más de cuarenta mil perros, calculado en el programa Win Episcopo 2.0 (Thrusfield, 2001). La fórmula propuesta por Thrusfield (2007) se utilizó para determinar el tamaño de muestra necesario:

$$n=(1- (1-P)^{1/d})\cdot(N-(d/2) + 1$$

Donde:

n= tamaño de muestra

P= probabilidad de encontrar un caso

d= número mínimo de animales afectados, esperados en una población

N= tamaño de la población

El número de animales está en relación al supuesto de un estimado poblacional superior a los 40,000 caninos presentes en el área de estudio, cantidad para la que se requiere una muestra constante de 299 animales.

2.2. Población analizada

Se visitaron 15 parques recreativos de las siete provincias de Costa Rica, en el periodo de junio del 2011 a setiembre del 2012. La cantidad de animales muestreados en cada parque se presenta en el Cuadro 3.

Según List (2009), en Costa Rica, existe un índice poblacional de 1,56 perros por hogar en estratos bajos y 1,65 por hogar en estratos altos. Para el 2011, había un total de 1 211 964 viviendas ocupadas, 62% concentradas en la Región Central. La distribución por provincia fue de 33,1% en San José, 19,5% en Alajuela, 10,8% en Cartago, 10,1% en Heredia, 9,8% en Puntarenas, 9,0% en Limón y 7,6% en Guanacaste (INEC 2012; FUPROVI 2012, Fornaguera 2013). Con promedio de 1,6 perros por vivienda se obtiene una población canina total de 1 939 142 en el país. Se determinó la cantidad de perros por parque para respetar la proporción anterior, sin embargo, la realidad del muestreo en el lugar, marcó cambios en la cantidad final de individuos muestreados por parque.

El criterio de selección empleado para muestrear estas zonas geográficas fue el hecho de que ya se había identificado *Ehrlichia* spp. (Ábrego 2008; Soto 2010; Romero 2008) y *Rickettsia* spp. (Hun et al. 2008; Labruna et al. 2011) en todas las provincias, menos en Guanacaste, por lo que se incluyó para obtener datos nacionales. Se buscó parques con altos niveles de concurrencia. Cada parque fue visitado una sola vez durante los días de mayor afluencia (fines de semana).

2.3. Entrevista y ficha clínica

Se completó una entrevista con preguntas semicerradas (Anexo 1) con información proporcionada por el propietario del animal. Se recolectaron datos tales como convivencia con otros animales, desparasitaciones y presencia o ausencia de síntomas clínicos, entre otros. En los

casos de los animales deambulantes, algunos datos se pudieron inferir, tales como la permanencia fuera de un hogar, mientras que otros datos se obviaron. Además, se completó una ficha clínica (Anexo 2), en busca de indicios que pudieran sugerir el curso de enfermedad de los agentes estudiados.

Las encuestas y las fichas clínicas fueron aplicadas personalmente por parte de cada uno de los miembros del grupo investigador, antes de la toma de muestras. Previamente, los instrumentos fueron validados y los investigadores fueron capacitados para su aplicación.

Los únicos criterios de exclusión de un sujeto fueron: negativa del propietario a otorgar el consentimiento para la toma de las muestras o algún otro tipo de impedimento para tomar las muestras de sangre o ectoparásitos. El muestreo se realizó con el permiso de las autoridades de los parques en el caso de los perros deambulantes.

2.4. Toma, transporte y manejo de las muestras

Se recolectó muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante, para la extracción del suero; con independencia de la edad, sexo, raza o estatus clínico del perro o de la existencia o no de un propietario.

A cada animal se le asignó un número único y consecutivo, que fue su código a lo largo de todo el estudio. Los recipientes para la colecta de muestras se rotularon con ese mismo código.

Se tomó las muestras de sangre de las venas safena, cefálica o yugular, con agujas calibre 20°-25°, usando jeringas de 3-5 ml, previa desinfección de la zona con alcohol.

Las muestras de sangre se almacenaron en una hielera a baja temperatura para su transporte al Laboratorio de Entomología de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional, en donde se

almacenaron a 4°C hasta la realización del frotis, los análisis clínicos y la separación del suero. Luego se congelaron a -20°C, hasta la realización de las pruebas serológicas y moleculares.

Los ectoparásitos (garrapatas, pulgas y piojos) encontrados en los perros, fueron almacenados en tubos colectores y se les asignó el mismo código del animal. Se recolectaron, de forma manual, todos los ectoparásitos posibles. En los individuos que presentaron una infestación mayor de 25 ectoparásitos, se recolectaron los que se pudieron tomar en un lapso de diez minutos. Se tomaron ectoparásitos de todos los lugares anatómicos.

Para la captura de las pulgas y piojos se utilizó un peine de cerdas finas y un atomizador con agua para imposibilitar su movimiento. Los tubos colectores se llenaron con alcohol al 70% y se transportaron hasta el laboratorio para ser identificados.

2.5. Análisis clínicos y frotis sanguíneo

Para determinar el valor del hematocrito se utilizaron tubos capilares y la microcentrífuga HETTICH® (18600 x g; 5 minutos). El valor fue obtenido de un lector de hematocrito marca DAMON/IEC.

Para realizar los frotis sanguíneos, la sangre se agitó durante 30 minutos. Luego, se tomó una gota con ayuda de una lámina portaobjetos, se colocó en otra lámina portaobjetos limpia, posteriormente se realizaron dos frotis, uno para el hemograma y otro para la observación de mórulas. Seguidamente, las láminas se dispusieron para el secado, para proceder después a teñirlas con el método de tinción Giemsa (Cowell et al. 2008); luego de que las láminas se tiñeron, se almacenaron hasta el momento de la observación microscópica.

Para realizar el hemograma, se evaluó desde la región más gruesa hasta la región más delgada del frotis, usando primero los objetivos 10X y 20X, con el fin de establecer la presencia de

agregados plaquetarios o células con organismos fagocitados. La identificación de los diferentes tipos de células blancas (diferencial) se realizó con los objetivos 40X y 50X, la morfología de las células se evaluó utilizando los objetivos 40X y 100X, donde también se determinó el número de plaquetas (Cowell et al. 2008). Los valores hematológicos de referencia en perros se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores hematológicos internacionales de referencia en perros

Parámetro	Unidad	Valores de referencia ^a	Valores de referencia ^b	Valores de referencia ^c
		Jóvenes	Adultos	Adultos
Hematocrito	%	30–45	37–55	37–55
Hemoglobina	g/dl	10–13	12–18	12–18
CHCM	g/dl	32–34	32–36	32–36
Leucocitos	μl	6000–15700	6000–17000	6000–17000
N. Bandas	μl	0–300	0–500	0–300
N. Segmentados	μl	3000–10500	3000–11000	3000–11500
Eosinófilos	μl	120–1250	100–1250	100–1250
Basófilos	μl	0	Raramente	Raramente
Linfocitos	μl	1200–4800	1000–4800	100–4800
Monocitos	μl	150–1350	150–1350	150–1350
Trombocitos	x10 ³ μl	180–405	200–500	200–500

^a Feldman et al. (2000)

^b Cowell et al. (2008)

^c Weiss y Wardrop (2010)

Se empleó un microscopio convencional con objetivo 100X y aceite de inmersión para buscar mórulas intracelulares en las células sanguíneas respectivas, sobre todo en la zona más fina de la capa celular. Se consideró positiva a una muestra, cuando se le determinó la presencia de mórulas en al menos una célula.

2.6. Identificación de los ectoparásitos

Se realizó la clasificación taxonómica de los ectoparásitos con las llaves de clasificación de garrapatas de Acha (1979), Fairchild et al. (1996) y Jones et al. (1972), las llaves de clasificación

de pulgas de Acosta y Morrone (2003) y las llaves de clasificación de piojos de Emerson y Price (1975) y Zlotorzycska et al. (1974), además de las llaves de clasificación para los tres ectoparásitos de Barriga (1997) y de USDHEW (1967). Los ectoparásitos de cada animal se separaron por especie, sexo y estadio en tubos Eppendorf y se almacenaron en el laboratorio a -20°C hasta la extracción de ADN y la realización de la PCR.

2.7. Diagnóstico serológico

Para el diagnóstico de anticuerpos contra *E. canis*, se utilizaron técnicas comerciales de Inmunocromatografía de Membrana (ICM) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La ICM utilizada fue la prueba comercial “Speed Ehrli” de Virbac, Bio Veto Test, Roma, Italia (sensibilidad del 87% y especificidad del 95%) y la IFI utilizada fue “*E. canis* and *Anaplasma phagocytophilum* MIF Canine IgG Antibody Kit” de Fuller Laboratories, California, EE.UU. (sensibilidad y especificidad del 100%). Se siguió las indicaciones de los fabricantes. Las muestras fueron analizadas, en la IFI, solamente en un título (1/80) y las muestras que exhibieron fluorescencia, se consideraron positivas.

Por las características de sensibilidad de la prueba *Speed Ehrli*, se utilizó la metodología de “pruebas múltiples en paralelo”, es decir, se estableció como positiva aquella muestra que resultó positiva a alguna de las dos pruebas, o a ambas (Thrusfield 2007).

Para la detección de anticuerpos contra *Rickettsia* spp. se utilizó la técnica de IFI con antígenos de *R. rickettsii*, *R. amblyommii* y *R. felis*. Los antígenos utilizados se obtuvieron de cepas autóctonas (*R. rickettsii* cepa CR-2010, *R. amblyommii* cepa 9-CC-1 y *R. felis* cepa OP-16-1). Los sueros que presentaron títulos igual o mayor a 1/32 se consideraron positivos a *Rickettsia* spp. Cada una de las muestras se analizó al título base y las que resultaron positivas fueron

analizadas hasta el título final. Debido al posible serocruce, se determinó una especie vinculada a una reacción inmunológica, en muestras que exhibieron un título cuatro veces mayor a una especie de *Rickettsia* que a las restantes; cuando esto no fue posible, se consideraron indefinidas (R.i.) . El análisis de sueros se efectuó en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (Pacheco 2013), las bases de datos y resultados fueron compartidos para realizar el análisis estadístico en el presente estudio.

2.8. Diagnóstico molecular

La extracción de ADN de todas las muestras de sangre de perros se realizó con el kit comercial “Wizard Genomic” de PROMEGA® y la extracción de ADN de ectoparásitos, con el kit comercial “DNeasy Blood and Tissue Kit” de QIAGEN®, Chatsworth, CA, siguiendo los protocolos propuestos por las casas comerciales. Las garrapatas se analizaron en grupos de la misma especie, del mismo individuo, según la siguiente prioridad, en el caso de que se presentaran diferentes sexos y estadios: hembras > ninfas > machos > larvas. Las pulgas y los piojos fueron analizados todos sin excepción, en grupos, por especies, del mismo individuo.

Para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp. de sangre y ectoparásitos, se amplificó una porción correspondiente al gen *16S rARN*, mediante la PCR convencional anidada.

Se emplearon los cebadores ECC (5´-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3´) y ECB (5´-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3´) para amplificar un segmento de 478 pb, correspondiente al gen *16S rARN* de las especies pertenecientes al género *Ehrlichia*. Cada reacción consistió de 12,5 µl de Master Mix (Fermentas®); 0,5 µl de cada cebador (0,4 µM); 9,5 µl de agua libre de nucleasas (Fermentas®) y 2 µl de ADN, para una reacción de 25 µl.

El protocolo incluyó un periodo de desnaturalización a 95°C por dos minutos. Siguió 40 ciclos de 60 segundos, a 95°C, 60 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C, finalizando con cinco minutos a 72°C (Romero 2008).

Los productos de la primera PCR fueron empleados como plantillas para la corrida de las PCR específicas de especie. Los cebadores empleados fueron ECAN5 (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') y HE3 para la detección de *E. canis*, HE1 (5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT-3') Y HE3 para la detección de *E. chaffeensis* y HE3 y EE5 (5'-CAATTAATAAATAGTCTCTGACTATTTAG-3') para la detección de *E. ewingii*; los tamaños de los productos esperados son de 390 pb (389 *E. canis*, 390 *E. chaffeensis* y 392 *E. ewingii*). En éstas, las reacciones consistieron de 12,5 µl de Master Mix (Fermentas®); 0,5 µl de cada cebador (0,2 µM); 10,5 µl de agua libre de nucleasas (Fermentas®) y 1 µl de ADN, para una reacción de 25 µl y el protocolo utilizado para la amplificación fue el mismo que se empleó para la amplificación del primer producto (Romero 2008).

Se usaron controles positivos de *E. canis* donados por el Dr. Roman Ganta (Kansas State University, EE.UU.); como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Fermentas®).

Posteriormente, se realizó una electroforesis con 5 µl de los productos obtenidos de la PCR mezclado con el buffer de carga 6X, en geles de agarosa al 2% en amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE), teñidos con 0,5 µl del fluorocromo GelRed DNA Stain (Biotium®). Adicionalmente, se colocó 0,8 µl del marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Sm0321). Lo anterior se corrió en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 45 minutos. Se observó el gel con luz ultravioleta a 340 nm. Se consideraron positivas las muestras en las que se observó una banda con el tamaño esperado.

Se secuenciaron algunas muestras de ADN de sangre y ectoparásitos positivas enviando los productos a MACROGEN®, Corea, con el fin de confirmar los resultados.

Los ectoparásitos fueron analizados, para *Rickettsia* spp. (gen *gltA*), en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (Pacheco 2013).

2.9. Análisis de los datos

Se ingresó la información obtenida en la entrevista, en el examen objetivo particular y en los resultados de las pruebas diagnósticas en una base de datos digital; después, se hizo una traducción a un formato numérico para facilitar el análisis mediante las aplicaciones estadísticas.

Para el análisis de los datos se utilizó los paquetes Win Episcopy 2.0 (Thrusfield et al. 2001), InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (Sequeira et al. 2013), EGRET® 2.0 1999 (Cytel Software Corporation) (Romero et al. 2005) y Epiinfo 7 (Centers for Disease Control and Prevention Division of Public Health Surveillance and Informatics, Epidemiology Program Office) (Binquet et al. 1998; Thrusfield 2007).

Para cumplir con los dos primeros objetivos, se realizó un análisis descriptivo de los resultados a través de medidas de tendencia central (media), medidas de dispersión (desviación estándar e intervalo de confianza 95%) y frecuencias (%) por factores, se determinó la presencia y ausencia de los agentes causantes de la enfermedad y se hizo una distribución de frecuencias de resultados positivos y negativos con los respectivos porcentajes. Además, se analizaron los valores hematológicos por medio de la prueba de t-student para cada grupo, negativo y positivo, dependiendo de las pruebas diagnósticas, para obtener así, diferencias altamente significativas ($P < 0,001$), diferencias significativas ($P < 0,05$) y diferencias débiles ($P = 0,05-0,10$). Además, se realizó el análisis de los factores de riesgo, asociados a seropositividad y positividad a la PCR,

tanto a *E. canis* como a *Rickettsia* spp. Este análisis se hizo por medio de las pruebas de regresión logística y regresión de Poisson, se estimó el riesgo mediante la razón de posibilidades (odds ratio, OR), la razón de prevalencia (RP) y la razón de tasa (Rate Ratio).

3. RESULTADOS

3.1. Características de la población analizada

Se muestreó un total de 441 individuos en los quince parques recreativos de las siete provincias de Costa Rica.

En la Figura 1 se destacan los sitios de muestreo y el área de cobertura. La proporción de perros estudiados en la Región Central (312, 70,7%) fue similar a la distribución real (62%, ver 2.1). En San José, se visitó la mayor cantidad de parques (seis), seguido de Limón (tres) y Alajuela (dos) y en el resto de las provincias, uno.

En el Cuadro 3 se detalla el número de perros analizados por parque, provincia y cantón de origen.

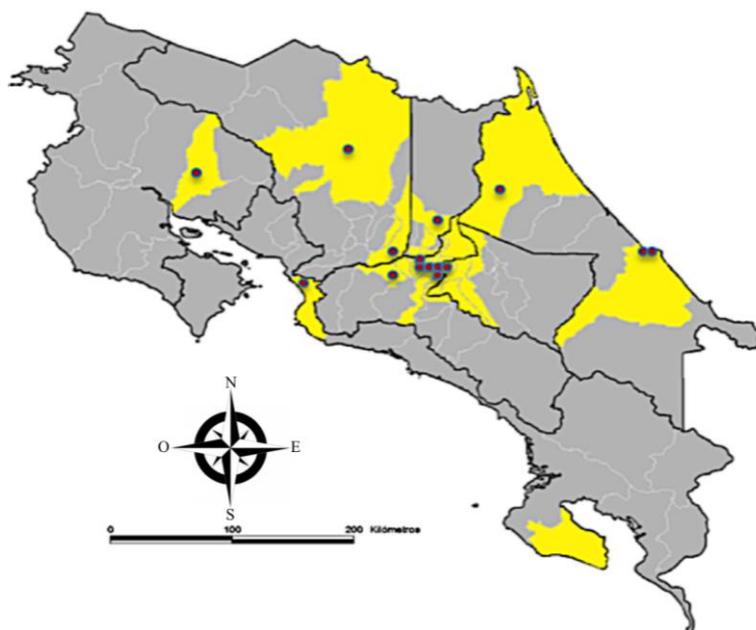


Figura 1. Área de cobertura del muestreo **Círculos:** sitios de muestreo **Zonas en amarillo:** cantones de origen de los perros muestreados

Cuadro 3. Número de perros analizados en cada parque, según su origen por provincia y cantón

Provincia	Parque	Origen de los perros		Parque	Provincia
		# cantones	# provincias	Perros muestreados (%)	Perros muestreados (%)
San José	La Sabana	11	2	62 (14,1)	198 (44,8)
	La Paz	6	2	36 (8,2)	
	Desamparados	1	1	33 (7,5)	
	Aserri	4	1	26 (5,7)	
	Barrio México	1	1	16 (3,6)	
	Ciudad Colón	1	1	25 (5,7)	
Alajuela	Agricultor	4	3	27 (6,1)	45 (10,2)
	La Fortuna	1	1	18 (4,1)	
Cartago	ITCR	5	2	39 (8,9)	39 (8,9)
Heredia	Monte de la Cruz	7	3	30 (6,8)	30 (6,8)
Limón	Guápiles	1	1	27 (6,1)	54 (12,3)
	Asís Esna	1	1	23 (5,2)	
	Vargas	1	1	4 (0,9)	
Guanacaste	Cañas	1	1	43 (9,8)	43 (9,8)
Puntarenas	Quebrada Ganado	2	1	32 (7,3)	32 (7,3)
Total				441 (100)	441 (100)

ITCR: Instalaciones recreativas del Instituto Tecnológico de Costa Rica

La descripción de la población canina muestreada en los quince parques, según sexo, edad, talla, largo de pelo, estatus de pertenencia y raza, se desglosa en el Cuadro 4. El 62% de los perros tenía entre uno y cinco años (275), eran de talla mediana (323), de pelo corto (317) y de raza pura (243), y se presentó una distribución equitativa del sexo.

Del total de 441 perros, 42 (9,5%) no tenían propietario y se les consideró animales deambulantes.

Cuadro 4. Descripción de la población canina muestreada en quince parques recreativos

Característica	Estrato	Perros	
		n=441	(%)
Sexo	Hembra	222	50,5
	Macho	219	49,5
Edad en años	<1	85	19,1
	1-5	275	62,5
	6-9	57	13,0
	>10	24	5,4
Talla	Pequeños	108	24,5
	Medianos	323	73,2
	Grandes	10	2,3
Largo de pelo	Corto	317	71,9
	Largo	124	28,1
Estatus de pertenencia	Con propietario	399	90,5
	Deambulante	42	9,5
Raza	Sin raza definida	198	44,9
	Caniche	47	10,7
	Schnauzer miniatura	28	6,3
	Staffordshire	24	5,4
	Pinscher miniatura	21	4,8
	Labrador retriever	15	3,4
	Otra raza	108	24,5

3.2. Entrevista

Se administró un instrumento de entrevista en 399 casos. No se pudo obtener información de 42 perros deambulantes, por lo tanto, no se toman en cuenta en los resultados. La información obtenida de la entrevista respecto a convivencia, presencia y control de ectoparásitos, y frecuencia de visitas a los parques recreativos se muestra en el Cuadro 5.

Se logró determinar un primer bloque de información general sobre los perros, a saber: asistencia a los parques durante meses y hasta años (66,4%); permanencia dentro de la casa (39,6%); convivencia con una, dos o tres personas (71,4%); convivencia con uno, dos o tres

perros (49,1%); sus propietarios han observado sobre ellos garrapatas (55,9%); sus propietarios han observado sobre ellos pulgas (64,4%); aplicación de algún tratamiento contra garrapatas (61,9%); aplicación de algún tratamiento contra pulgas (67,7%).

En relación con preguntas acerca de la historia clínica de los perros, un 3,6% de los propietarios manifestó que su veterinario, en algún momento, sospechó que su mascota tuvo síntomas de ehrlichiosis, mientras que en un 2,3% de los perros se diagnosticó la enfermedad (Cuadro 6).

Síntomas sugestivos de ehrlichiosis, que los propietarios observaron en el pasado, en los perros fueron: sangrado (75), anorexia (71), depresión (61), manchas rojas en la piel (42), debilidad (35), conjuntivitis (30), fiebre (29), disnea (25), tumores compatibles con linfadenomegalia (21), ataxia (19), hematuria (8), orquitis o edema escrotal (3).

3.3. Examen objetivo particular

El examen objetivo particular realizado a 441 perros determinó, en la mayoría de los perros, una buena condición corporal (68,7%), una actitud alerta (99,1%), llenado capilar ≤ 2 segundos (94,8%), membranas mucosas rosadas (87,8%), temperatura rectal entre 38,6°C y 39,5°C (63,0%). Solamente en el 28,6% y el 37,7% de los perros, se encontraron garrapatas y pulgas, respectivamente. Los resultados de los perros al examen objetivo particular y el grado de infestación con ectoparásitos se detallan en el Cuadro 7.

Los síntomas determinados en la población de estudio fueron: ojo rojo (14), linfadenomegalia (9), petequias (7), edema escrotal (4), tos (4), ataxia (2), artritis (1) y hematuria (1).

Cuadro 5. Resultados de las entrevistas sobre convivencia, presencia y control de ectoparásitos y frecuencia de visitas de los perros a los parques recreativos

Variable	Estrato	Perros	
		n=399	(%)
¿Con qué regularidad visita el parque?	Primera vez	110	27,6
	Meses-Años	265	66,4
	ND	24	6,0
Lugar de estancia del perro: fuera de la casa, dentro de la casa o la combinación de fuera y dentro.	Fuera	134	35,6
	Dentro	158	39,6
	Dentro y fuera	107	26,8
Cantidad de personas que conviven con el perro	1-3	285	71,4
	≥4	114	28,6
Cantidad de perros que conviven con el perro	0	164	41,1
	1-3	196	49,1
	≥4	39	9,8
Cantidad de gatos que conviven con el perro	0	330	82,7
	1-2	63	15,8
	≥3	6	1,5
¿El perro ha tenido garrapatas en el pasado?	Sí	223	55,9
	No	152	38,1
	ND	24	6,0
¿Con qué se ha tratado?	Tópico	196	49,1
	Parenteral	35	8,8
	Oral	27	6,8
	No	117	29,3
	ND	24	6,0
¿El perro ha tenido pulgas en el pasado?	Sí	257	64,4
	No	118	29,6
	Desconocido	24	6,0
¿Con qué se ha tratado?	Tópico	193	48,4
	Parenteral	25	6,3
	Oral	28	7,0
	No	129	32,3
	ND	24	6,0
¿El perro ha tenido piojos en el pasado?	Sí	11	2,8
	No	364	91,2
	ND	24	6,0
¿Con qué se ha tratado?	Tópico	38	9,5
	Parenteral	2	0,5
	Oral	9	2,3
	No	326	81,7
	ND	24	6,0

ND: No determinado

Cuadro 6. Resultados de las entrevistas sobre historia clínica de los perros muestreados

Variable	Estrato	Perros	(%)
¿Alguna vez el perro fue diagnosticado con ehrlichiosis?	Sí	9	2,3
	No	390	97,7
¿Hace cuánto tiempo?	2 meses	2	22,2
	1 a 4 años	4	44,4
	No sabe	3	33,3
¿Con qué se trató?	Doxiciclina	2	22,2
	Otro	3	33,3
	No sabe	2	22,2
	No	2	22,2
¿Alguna vez su veterinario tuvo la sospecha de que su mascota tuviera ehrlichiosis?	Sí	16	3,6
	No	383	86,9
¿Hace cuánto tiempo?	1 mes	4	25,0
	2 meses	2	12,4
	4 meses	3	18,7
	1- 6 años	7	12,4
¿Con qué se trató?	Doxiciclina	2	12,5
	Otros	6	37,5
	No sabe	2	12,5
	No	6	37,5

3.4. Análisis clínicos y frotis sanguíneo

Los valores hematológicos normales de la población total de perros de parques recreativos se muestra en el Cuadro 8.

De 361 muestras analizadas con la técnica del frotis sanguíneo, solamente en dos casos se pudo determinar la presencia de mórulas, ninguna de estas fue positiva a la PCR en sangre y solamente una fue seropositiva.

Cuadro 7. Resultados del examen objetivo particular y del grado de infestación con ectoparásitos realizado a los perros en estudio

Variable	Estrato	Perros	
		n=441	(%)
Condición Corporal	Buena	303	68,7
	Regular	23	5,2
	Mala	10	2,3
	Obeso	105	23,8
Actitud	Alerta	437	99,1
	Débil	1	0,2
	Deprimido	3	0,7
Llenado capilar (s)	≤ 2	418	94,8
	≥ 3	23	
Membranas mucosas	Rosadas	387	87,8
	Pálidas	49	11,1
	Muy pálidas	5	1,1
Temperatura rectal (°C)	≤ 38,5	77	12,5
	38,6-39,5	278	63,0
	≥ 39,6	86	19,5
Grado de infestación con garrapatas	0	315	71,4
	1-49	122	27,7
	≥ 50	4	0,9
Grado de infestación con pulgas	0	275	62,4
	1-49	159	36,1
	≥ 50	7	1,6
Grado de infestación con piojos	0	438	99,3
	1-10	3	0,7

Cuadro 8. Valores hematológicos y negativos en todas las pruebas aplicadas a la población total de perros

Variable	Población en general			Sujetos negativos a todas las pruebas		
	n	Media	DE	n	Media	DE
Hematocrito	361	44,0	8,23	209	45,3	45,3
Hemoglobina	349	14,5	2,88	204	15,0	2,6
CHCM	349	32,8	2,50	204	33,0	2,3
Trombocitos	326	204735,0	105430,0	197	224656,1	107268,4
Leucocitos	349	11065,0	3927,8	204	11472,6	3970,5
N. Bandas	349	220,1	341,2	204	235,0	403,3
N. Segmentados	349	6943,0	8259,5	204	7327,0	10559,9
Eosinófilos	349	962,7	1389,7	204	1054,8	1625,7
Basófilos	349	15,3	127,0	204	19,8	161,8
Linfocitos	349	3229,4	2969,2	204	3519,5	3601,8
Monocitos	349	212,19	274,23	204	222,5	303,5

n: Número de individuos analizados DE: Desviación Estándar CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

3.5. Ectoparásitos

Del total de 441 perros, 127 (28,8%) tenían garrapatas; 116 individuos estaban infestados con *R. sanguineus*, cuatro con *A. ovale*, dos con *A. cajennense*, uno con *A. maculatum*, uno con *I. boliviensis* y uno con una garrapata que no se pudo identificar. Además, un perro tuvo infección concomitante con *R. sanguineus* y *A. cajennense*, y dos individuos con *R. sanguineus* y *A. ovale*. En total, se extrajeron 623 garrapatas sobre los perros muestreados, 608 correspondieron a *R. sanguineus*, nueve a *A. ovale*, tres a *I. boliviensis*, dos a *A. cajennense*, una a *A. maculatum*. La distribución de las garrapatas por sexo y estadio se destaca en el Cuadro 9 y su distribución geográfica en los Cuadros 11 y 12.

Cuadro 9. Distribución de garrapatas, según sexo y estadio, encontradas en los perros en estudio

Nombre científico	Hembra	Macho	Ninfa	Larva	Total	(%) n=623	Perros infestados	(%) Parcial n=130	(%) Global n=441
<i>R. sanguineus</i>	280	250	64	14	608	97,5	119	91,5	27,0
<i>A. ovale</i>	4	4	0	0	8	1,4	6	4,6	1,4
<i>I. boliviensis</i>	1	0	2	0	3	0,4	1	0,8	0,2
<i>A. cajennense</i>	0	2	0	0	2	0,3	2	1,5	0,5
<i>A. maculatum</i>	0	1	0	0	1	0,2	1	0,8	0,2
Indefinido	0	0	0	1	1	0,2	1	0,8	0,2
Total	285	257	66	15	623	100	130 ^a	100	29,5

^a De 441 perros, 127 tenían solamente una especie de garrapata mientras 3 tenían infestación concomitante con otra especie

Del total de 441 perros, 165 (37,4%) tenían pulgas, 153 *C. felis*, 9 *P. simulans*, uno *Pulex* spp., uno *E. gallinacea* y uno una pulga no identificada, mientras que ocho tuvieron infestación concomitante: *C. felis/P. simulans* (6), *C. felis/Pulex* spp. (1) y *C. felis/E. gallinacea* (1). Se recolectó un total de 544 pulgas sobre los perros muestreados: 509 *C. felis*, 31 *P. simulans*, dos *Pulex* spp. y una *E. gallinacea*. El desglose de las especies de pulgas, por sexo, se muestra en el Cuadro 10 y su distribución geográfica en los Cuadros 11 y 12.

Solamente, en el parque Asís-Esna de Limón se encontraron cinco piojos (cuatro *H. spiniger* y un *T. canis*) sobre tres perros (0,7%).

Cuadro 10. Distribución de pulgas, según sexo, encontradas en los perros en estudio

Nombre científico	Hembra	Macho	Total	(%) n=544	Perros infestados	(%) Parcial n= 173	(%) Global n= 441
<i>C. felis</i>	364	145	509	93,6	161	93,0	36,6
<i>P. simulans</i>	23	8	31	5,7	9	5,2	2,0
<i>Pulex</i> spp.	2	0	2	0,4	1	0,6	0,2
<i>E. gallinacea</i>	1	0	1	0,2	1	0,6	0,2
Indefinido	1	0	1	0,2	1	0,6	0,2
Total	390	153	544	100	173 ^a	100	39,2

^a De 441 perros, 165 tenían solamente una especie de garrapata mientras 8 tenían infestación concomitante con otra especie

Cuadro 11. Distribución geográfica de las garrapatas y las pulgas encontradas en los perros en estudio, según la ubicación geográfica de los parques recreativos

Provincia	Parque	Garrapatas (total de garrapatas/perros infestados)						Pulgas (total de pulgas/perros infestados)				
		<i>R.s</i>	<i>A.o</i>	<i>A.c</i>	<i>A.m</i>	<i>I.b</i>	I	<i>C.f</i>	<i>P.s</i>	<i>P.sp</i>	<i>E.g</i>	I
San José	La Sabana	34	4	-	-	-	-	39	-	-	-	-
	La Paz	12	1	-	-	-	-	34	-	-	-	-
	Desamparados	22	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-
	Aserrí	1	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
	Barrio México	25	-	-	-	-	-	69	-	-	-	-
	Ciudad Colón	29	1	-	-	-	-	22	-	-	-	-
Alajuela	Agricultor	30	-	-	-	-	1	36	-	-	-	-
	La Fortuna	48	2	-	1	-	-	5	-	2	-	-
Cartago	ITCR	51	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-
Heredia	Monte de la Cruz	2	-	-	-	3	-	34	26	-	1	1
Limón	Guápiles	109	-	-	-	-	-	23	-	-	-	-
	Asís Esna	88	-	-	-	-	-	44	1	-	-	-
	Vargas	1	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-
Guanacaste	Cañas	133	-	2	-	-	-	121	-	-	-	-
Puntarenas	Quebrada Ganado	23	1	-	-	-	-	9	-	-	-	-
Total		608	9	2	1	3	1	509	31	2	1	1

R.s: *R. sanguineus* *A.o:* *A. ovale* *A.c:* *A. cajennense* *A.m:* *A. maculatum* *I.b:* *I. boliviensis* *C.f:* *C. felis* *P.s:* *P. simulans* *P.sp:* *Pulex* sp. *E.g:* *E. gallinacea* **I:** Indefinido

Cuadro 12. Porcentajes de infestación por especie de garrapatas y pulgas, según la ubicación geográfica de los parques recreativos

Provincia	Parque	Perros con garrapatas/ Total perros muestreados (%)	Total Provincia		# de <i>pooles</i> por especie de garrapata					Perros con pulgas/ Total perros muestreados (%)	Total Provincia		# de <i>pooles</i> por especie de pulga				
			Perros con garrapatas/ Total perros muestreados (%)		<i>R.s</i>	<i>A.o</i>	<i>A.c</i>	<i>A.m</i>	<i>I.b</i>		<i>I</i>	Perros con pulgas/ Total perros muestreados (%)		<i>C.f</i>	<i>P.s</i>	<i>P.sp</i>	<i>E.g</i>
San José	La Sabana	9/62 (14,5)	31/198 (15,7)	7	2	-	-	-	-	13/62 (21,0)	66/198 (33,3)	13	-	-	-	-	
	La Paz	2/36 (5,6)		2	1	-	-	-	-	13/36 (36,1)		13	-	-	-	-	
	Desamparados	7/33 (21,2)		7	-	-	-	-	-	12/33 (36,4)		12	-	-	-	-	
	Aserrí	1/26 (3,8)		1	-	-	-	-	-	6/26 (23,1)		6	-	-	-	-	
	Barrio México	4/16 (25,0)		4	-	-	-	-	-	14/16 (87,5)		15	-	-	-	-	
	Ciudad Colón	8/25 (32,0)		8	1	-	-	-	-	8/25 (32,0)		8	-	-	-	-	
Alajuela	Agricultor	9/27 (33,3)	20/45 (44,4)	8	-	-	-	-	1	10/27 (37,0)	14/45 (31,1)	10	-	-	-	-	
	La Fortuna	11/18 (61,1)		9	1	-	1	-	-	4/18 (22,2)		4	-	1	-	-	
Cartago	ITCR	5/39 (12,8)	5/39 (12,8)	5	-	-	-	-	-	4/39 (10,3)	4/39 (10,3)	4	-	-	-	-	
Heredia	Monte de la Cruz	2/30 (6,6)	2/30 (6,6)	1	-	-	-	1	-	20/30 (66,6)	20/30 (66,6)	16	7	-	1	1	
Limón	Guápiles	11/27 (40,7)	25/54 (46,3)	11	-	-	-	-	-	11/27 (40,7)	27/54 (50,0)	11	-	-	-	-	
	Asís Esna	13/23 (56,5)		13	-	-	-	-	-	13/23 (56,5)		12	1	-	-	-	
	Vargas	1/4 (25,0)		1	-	-	-	-	-	3/4 (75,0)		2	1	-	-	-	
Guanacaste	Cañas	26/43 (60,5)	26/43 (60,5)	25	-	2	-	-	-	26/43 (60,5)	26/43 (60,5)	26	-	-	-	-	
Puntarenas	Quebrada Ganado	18/32 (56,3)	14/32 (56,3)	17	1	-	-	-	-	9/32 (28,1)	9/32 (28,1)	9	-	-	-	-	
Total		127/441 (28,8)	127/441 (28,8)	119	6	2	1	1	1	165/441 (37,4)	165/441 (37,4)	161	9	1	1	1	

R.s: *R. sanguineus* *A.o:* *A. ovale* *A.c:* *A. cajennense* *A.m:* *A. maculatum* *I.b:* *I. boliviensis* *C.f:* *C. felis* *P.s:* *P. simulans* *P.sp:* *Pulex* sp. *E.g:* *E. gallinacea* *I:* Indefinido

3.6. *Ehrlichia canis*

De un total de 408 muestras analizadas por IFI, 95 (23,2%) presentaron anticuerpos contra *E. canis*, mientras que de 403 muestras analizadas por ICM, 121 (30,0%) también presentaron anticuerpos (Cuadro 13). Utilizando la metodología de las “pruebas múltiples en paralelo”, se determinó 131 (32,1%) animales como seropositivos. El porcentaje de correspondencia entre las pruebas fue de 89,7% (Cuadro 14).

Los parques con mayor cantidad de muestras seropositivas fueron el Parque de Cañas (70,7%), el Parque de Quebrada Ganado (63,3%) y el Parque de Ciudad Colón (56,5%). La distribución geográfica de los perros seropositivos a *E. canis* por provincia y parque se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 13. Resultados de IFI e ICM para detectar anticuerpos contra *E. canis* en los sueros caninos

Resultado	IFI		ICM	
	Frecuencia	(%) n=408	Frecuencia	(%) n=403
Positivo	95	23,2 ^a	121	30,0 ^a
Negativo	313	76,7 ^a	278	68,9 ^a
Sospechoso	0	-	4	0,9 ^a
No analizadas	33	-	38	-
Total	441	100	441	100

IFI: Inmunofluorescencia indirecta ICM: Inmunocromatografía de membrana

^aLos porcentajes corresponden al total de muestras analizadas

Cuadro 14. Comparación de los resultados obtenidos con IFI e ICM para detectar anticuerpos contra *E. canis* en los sueros caninos

Resultado	IFI+	IFI-	Total
ICM +	85	6	91
ICM -	35	272	307
Total	120	278	398

Cuadro 15. Seroprevalencia de *E. canis* por provincias y parques

Provincia	Parque	Parque		Provincia	
		+/total (%)	(%) Global n=407 ^a	+/total (%)	(%) Global n=407 ^a
San José	La Sabana	15/52 (28,8)	3,7	43/179 (24,0)	10,6
	La Paz	2/32 (6,3)	0,5		
	Desamparados	7/31(22,6)	1,7		
	Aserrí	4/25 (16,0)	1,0		
	Barrio México	2/16 (12,5)	0,5		
	Ciudad Colón	13/23 (56,5)	3,2		
Alajuela	Agricultor	8/23 (34,8)	2,0	13/41 (31,7)	3,2
	La Fortuna	5/18 (27,8)	1,2		
Cartago	ITCR	11/35 (31,4)	2,7	11/35 (31,4)	2,7
Heredia	Monte de la Cruz	6/27 (22,2)	1,5	6/27 (22,2)	1,5
Limón	Guápiles	9/27 (33,3)	2,2	10/54 (18,5)	2,5
	Asís Esna-Vargas	1/27 (3,7)	0,2		
Guanacaste	Cañas	29/41 (70,7)	7,1	29/41 (70,7)	7,1
Puntarenas	Quebrada Ganado	19/30 (63,3)	4,7	19/30 (63,3)	4,7
Total		131/407 (32,2)	32,2	131/407 (32,2)	32,2

^a Corresponde al porcentaje del total de muestras analizadas

ITCR: Instalaciones recreativas del Instituto Tecnológico de Costa Rica

De un total de 407 muestras de sangre analizadas mediante PCR, se detectó en 13 (3,2%) ADN de *E. canis* (Cuadro 16), 10 (77,0%) de estas, mostraron además, anticuerpos contra *E. canis*. No se detectó ADN de *E. chaffeensis* o *E. ewingii* en ninguna de las muestras analizadas.

Del total de 130 *pooles* de garrapatas analizadas mediante PCR, nueve (6,9%) resultaron positivas para *E. canis* (Cuadro 16). Todas las garrapatas positivas a la PCR fueron *R. sanguineus* (cinco *pooles* de hembras, dos *pooles* de ninfas y dos *pooles* de machos) que provenían de nueve perros: siete (77,7%) perros seropositivos y negativos a PCR, y dos (28,6%) seropositivos y positivos a PCR.

Cuadro 16. Resultados de la PCR para *E. canis* en sangre y garrapatas

Resultado	Sangre		Garrapatas		
	n=441	(%)	n=130	(%)	Estadios
Positivo	13	3,2 ^a	9	6,9 ^a	5 H, 2 N, 2 M
Negativo	394	96,8 ^a	121	93,1 ^a	
No realizado	34	-	-	-	
Total	441	100	130	100	

^a Los porcentajes corresponden al total de muestras analizadas. H: Hembra N: Ninfa M: Macho

La mayor cantidad de perros PCR positivos se detectaron en los parques de Cañas (9,8%), Agricultor (8,7%) y Guápiles (7,4%). Asimismo, la mayor cantidad de garrapatas PCR positivas se hallaron en los parques de Cañas (18,5%), Agricultor (11,1%), Quebrada Ganado (11,1%) y Guápiles (9,1%). En el Cuadro 17 se presenta la distribución geográfica de las muestras de sangre y ectoparásitos, PCR positivas a *E. canis*.

La probabilidad de encontrar una garrapata PCR positiva, en perros con resultados PCR positivo fue de 25,0% y en perros seropositivos fue de 13,0%. En contraste, la probabilidad de encontrar una garrapata positiva en perros con resultados PCR negativos y seronegativos a *E. canis* fue de 6,3% y 3,0%, respectivamente.

La secuenciación de los productos de la PCR de tres muestras de sangre de perros de los parques de Cañas (1) y Guápiles (2) y una garrapata *R. sanguineus* de Cañas, confirmaron los resultados y determinaron una identidad de 100% entre ellos y un 99% de identidad con las cepas Jake (NR_074283.1), depositada en el Gen Bank, que se aisló de un perro en EE.UU. (Cuadro 18). El alineamiento de la secuencia obtenida de la sangre del perro de Cañas con la secuencia NR_074283.1 se muestra en la Figura 2.

Cuadro 17. Resultados de la PCR en sangre y garrapatas para *E. canis*, según la ubicación geográfica del parque

Provincia	Parque	Sangre		Garrapatas	
		+/total (%)	(%) Global n=407	+/total (%)	(%) Global n=407
San José	La Sabana	2/52 (3,8)	0,5	0/9 (-)	-
	La Paz	0/32 (-)	-	0/3 (-)	-
	Desamparados	0/31 (-)	-	0/7 (-)	-
	Aserrí	0/25 (-)	-	0/1 (-)	-
	Barrio México	0/16 (-)	-	0/4 (-)	-
	Ciudad Colón	1/23 (4,3)	0,2	0/9 (-)	-
Alajuela	Agricultor	2/23 (8,7)	0,5	1/9 (11,1)	0,8
	La Fortuna	0/18 (-)	-	0/11 (-)	-
Cartago	ITCR	1/35 (2,9)	0,2	0/5 (-)	-
Heredia	Monte de la Cruz	0/27 (-)	-	0/2 (-)	-
Limón	Guápiles	2/27 (7,4)	0,5	1/11 (9,1)	0,8
	Asís Esna-Vargas	1/27 (3,7)	0,2	0/14 (-)	-
Guanacaste	Cañas	4/41 (9,8)	1,0	5/27 (18,5)	3,8
Puntarenas	Quebrada Ganado	0/30 (-)	-	2/18 (11,1)	1,5
Total		131/407 (3,2)	3,2	9/130 (6,9)	6,9

ITCR: Instalaciones recreativas del Instituto Tecnológico de Costa Rica

Cuadro 18. Secuenciación de una porción del gen 16S RNA de *E. canis* detectado en las muestras positivas de sangre canina y garrapatas *R. sanguineus*

Muestra	Especie	Lugar de origen	Secuencia asociada en GenBank	Identidad (%)
Sangre	<i>C. lupus familiaris</i>	Guápiles	<i>Ehrlichia canis</i> str. Jake strain Jake 16S ribosomal RNA, complete sequence	99
Sangre	<i>C. lupus familiaris</i>	Guápiles	<i>Ehrlichia canis</i> str. Jake strain Jake 16S ribosomal RNA, complete sequence	99
Sangre	<i>C. lupus familiaris</i>	Cañas	<i>Ehrlichia canis</i> str. Jake strain Jake 16S ribosomal RNA, complete sequence	99
Garrapata	<i>R. sanguineus</i>	Cañas	<i>Ehrlichia canis</i> str. Jake strain Jake 16S ribosomal RNA, complete sequence	99

<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC T TAACACATGCAAGTCGAACG CT CAATTATTTATAGCC	60
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC C TAACACATGCAAGTCGAACG GA CAATTATTTATAGCC	63
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	TCTGGCTATAGGAAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGT	120
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	TCTGGCTATAGGAAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGT	123
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	AGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCCGAGGGGGAAAGAT	180
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	AGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCCGAGGGGGAAAGAT	183
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	TTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAA	240
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	TTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAA	243
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	GGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAAGTGGGTAATGGCTTACCAA	300
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	GGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAAGTGGGTAATGGCTTACCAA	303
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG	360
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG	363
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	CTATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTTTCAATAGGGAAGATAA	420
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	CTATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTTTCAATAGGGAAGATAA	423
<i>E. canis</i> _C286 16S rRNA	TGACGGT	427
<i>E. canis</i> Jake 16S rRNA	TGACGGT	430

Figura 2. Alineamiento de la secuencia de *E. canis* obtenida de un perro (secuencia *E. canis* _C286 16S rRNA) y la secuencia del GenBank (*E. canis* Jake 16S rRNA). En rojo se muestran los nucleótidos que no se alinearon con la secuencia del GenBank.

3.6.1. Análisis estadístico

Al analizar los valores hematológicos en dos grupos, los seropositivos y los seronegativos *E. canis* (Cuadro 19), se pudo determinar mediante la prueba de t-student, una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) en los valores de hematocrito, hemoglobina y conteo plaquetario y una diferencia débil ($P = 0,05-0,10$), en los valores de CHCM, leucocitos, linfocitos y monocitos. En todos los casos, las medias de las muestras positivas fueron menores a los promedios de las muestras negativas.

Cuadro 19. Análisis de los valores hematológicos en perros seropositivos y seronegativos a *E. canis* mediante la prueba de t-student

Variable	General			Positivos			Negativos			P
	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	361	44,0	8,23	109	40,5	9,3	242	45,5	7,2	<0,001
Hemoglobina	349	14,5	2,88	103	13,1	3,2	237	15,0	2,5	<0,001
CHCM	349	32,8	2,50	103	32,4	2,6	237	33,0	2,4	0,062
Trombocitos	326	204735,0	105430,0	94	165285,0	87971,0	224	222309,0	107609,0	<0,001
Leucocitos	349	11065,0	3927,8	103	10440,3	4035,0	237	11323,6	38545,0	0,065
Bandas	349	220,1	341,2	103	217,7	241,0	237	225,9	381,0	0,810
Segmentados	349	6943,0	8259,5	103	6189,0	2793,0	237	7262,5	9382,0	0,124
Eosinófilos	349	962,7	1389,7	103	893,4	4065,0	237	998,2	1529,0	0,469
Basófilos	349	15,31	127,0	103	11,5	52,0	237	17,6	150,0	0,581
Linfocitos	349	3229,4	2969,2	103	2844,5	1702,0	237	3364,9	3390,0	0,061
Monocitos	349	212,19	274,23	103	173,8	213,0	237	229,1	298,0	0,051

n: Número de individuos analizados **DE:** Desviación Estándar **P:** Probabilidad calculada entre los grupos Positivos y Negativos **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

En el análisis de los factores de riesgo, mediante la prueba de regresión de Poisson de perros seropositivos a *E. canis*, se determinó una asociación significativa ($P < 0,05$) con edad (∞), actitud depresiva y una asociación con el índice poblacional canino (∞). Además, se estableció una asociación débil ($P = 0,05 - 0,10$) con el índice poblacional canino (1-2), el llenado capilar lento y con el índice de infestación con garrapatas ($\geq 3,1$); finalmente, se determinó una asociación significativa ($P < 0,05$) con la raza, siendo esta un factor protectorio (Cuadro 20).

Al analizar los valores hematológicos de los grupos PCR positivos y PCR negativos a *E. canis*, se determinó, mediante la prueba de t-student, una diferencia altamente significativa en el número de linfocitos, y una diferencia débil en los valores de hematocrito y eosinófilos (Cuadro 21).

Cuadro 20. Análisis de los factores de riesgo en los perros seropositivos a *E. canis*, mediante regresión de Poisson

Variable	Estrato	n	+	%	IC _%		RP	IC _{RP}		RR	IC _{RR}		P	P Wald
					LI	LS		LI	LS		LI	LS		
Edad (años)	0-1	204	47	23,0	20,1	26,0								0,002
	2-7	169	65	38,5	34,7	42,2	1,7	1,2	2,3	1,6	1,2	2,2	0,001	
	8-15	36	19	52,8	44,5	61,1	2,3	1,5	3,4	1,8	1,2	3,0	0,011	
Actitud	Alerta	403	127	31,5	1,0	99,0								0,047
	Deprimido	4	2	50,0	27,0	36,0	1,6	0,6	4,3	1,3	1,0	1,7		
Llenado capilar	≤ 2s	384	117	30,5	31,8	72,6								0,076
	≥ 3s	23	12	52,2	25,9	35,1	1,7	1,1	2,6	1,7	0,9	3,1		
Índice poblacional canino	0	153	39	25,5	22,0	29,0								0,063
	1-2	179	62	34,6	31,1	38,2	1,4	1,0	1,9	1,3	1,0	1,8	0,093	
	≥ 3	35	17	48,6	40,1	57,0	1,9	1,2	3,0	1,7	1,9	2,7	0,022	
Índice de infestación garrapatas	≤1	197	53	26,9	23,7	30,1								0,294
	1,1-2	97	33	34,0	29,2	38,8	1,3	0,9	1,8	1,3	0,8	2,0	0,290	
	2,1-3	18	5	27,8	17,2	38,3	1,0	0,5	2,3	1,0	0,4	2,6	0,946	
	≥ 3,1	95	38	40,0	35,0	45,0	1,5	1,1	2,1	1,5	1,0	2,3	0,062	
Raza	SRD	189	73	38,6	19,9	31,5								0,022
	Pura	218	56	25,7	31,7	45,6	0,7	0,5	0,9	0,7	0,5	0,9		

n: Número de individuos en el estrato **+**: Número de seropositivos **%:** Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato **RP:** Razón de Prevalencia **RR:** Rate Ratio **IC_%-IC_{RP}-IC_{RR}:** Intervalo de Confianza (95%) para cada grupo **LI:** Límite Inferior **LS:** Límite Superior **P:** Probabilidad para la Rate Ratio **P Wald:** Probabilidad según test de Wald **SRD:** Sin Raza Definida

Cuadro 21. Análisis de los valores hematológicos en los perros PCR positivos y negativos a *E. canis*, mediante la prueba de t-student

Variable	General			Positivos			Negativos			P
	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	361	44,0	8,2	10	39,1	9,6	334	44,1	8,1	0,0564
Hemoglobina	349	14,5	2,9	8	12,9	3,4	334	14,5	2,9	0,1152
CHCM	349	32,8	2,5	8	32,9	2,4	334	32,9	2,5	0,9834
Trombocitos	326	204735,0	105430,0	8	227356,5	150433,9	313	204107,3	104423,0	0,5392
Leucocitos	349	11065,0	3927,8	8	9193,8	5367,8	334	11091,5	3847,6	0,1730
Bandas	349	220,1	341,2	8	185,6	176,5	334	222,7	347,0	0,7635
Segmentados	349	6943,0	8259,5	8	6509,4	4896,5	334	6933,7	8401,8	0,8870
Eosinófilos	349	962,7	1389,7	8	500,3	603,2	334	965,7	1388,9	0,0699
Basófilos	349	15,31	127,0							
Linfocitos	349	3229,4	2969,2	8	1780,9	841,7	334	3260,2	3012,0	0,0008
Monocitos	349	212,19	274,2	8	157,1	164,7	334	212,5	277,5	0,5748

n: Número de individuos analizados **DE:** Desviación Estándar **LI:** P: Probabilidad calculada entre los grupos Positivos y Negativos **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

El análisis de los factores de riesgo de perros PCR positivos a *E. canis*, mediante la prueba de regresión logística, estableció una asociación significativa ($P < 0,05$) con actitud depresiva, membranas mucosas muy pálidas, fiebre e índices mayores a 2,1 de infestación con garrapatas; además, se encontró una asociación débil ($P = 0,05-0,10$) con el índice poblacional canino (1-2) (Cuadro 22).

Cuadro 22. Análisis de los factores de riesgo en los perros PCR positivos a *E. canis*, mediante regresión logística

Variable	Estrato	n	+	%	IC%		RP	IC _{RP}		OR	IC _{OR}		P	P Wald	
					LI	LS		LI	LS		LI	LS			
Actitud	Alerta	416	12	2,9	-17,4	67,4	8,7	1,5	51,7	11,2	1,1	115,9	0,042		
	Deprimido	4	1	25,0	1,3	4,5									
Membranas Mucosas	Rosadas	368	9	2,4	1,6	3,3	3,2	1,6	6,3	2,7	0,7	10,4	0,144	0,071	
	Pálidas	47	3	6,4	2,8	9,9	2,6	0,7	9,3						
	Muy	5	1	20,0	2,1	37,9	8,2	1,3	53,0						10,0
Fiebre	No	343	8	2,3	0,7	3,9	4,4	1,2	15,8	4,8	1,2	19,3	0,026		
	Sí	29	3	10,3	-0,7	21,4									
Índice Poblacional	0	158	2	1,3	0,4	2,2	3,6	0,9	17,6	4,0	0,9	18,9	0,079	0,203	
	1-2	184	9	4,9	3,3	6,5	3,9								
	≥3	36	1	2,8	0,0	5,5	2,2								0,2
Índice de infestación garrapatas	≤1	204	2	1,0	0,3	1,7	4,1	0,8	2,0	4,2	0,8	23,4	0,101	0,069	
	1,1-2	100	4	4,0	2,0	6,0									4,1
	≥2,1	116	7	6,0	3,8	8,2									6,2

n: Número de individuos en el estrato **+**: Número de positivos **%:** Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato **RP:** Razón de Prevalencia **OR:** Odds Ratio **IC% -IC_{RP} -IC_{OR}:** Intervalo de Confianza (95%) para cada grupo **LI:** Límite Inferior **LS:** Límite Superior **P:** Probabilidad para la Odds Ratio **P Wald:** Probabilidad según test de Wald.

El análisis de los factores de riesgo de perros con garrapatas PCR positivas a *E. canis*, mediante prueba de regresión logística, determinó una asociación significativa ($P < 0,05$) con el llenado capilar lento. Además, se encontró una asociación débil ($P = 0,05-0,10$) con la sospecha del veterinario de ehrlichiosis y administración de un tratamiento fundamentado en dicha sospecha. Finalmente, se determinó una asociación débil ($P = 0,05-0,10$) con el sexo macho como factor protectorio (Cuadro 23).

Cuadro 23. Análisis de los factores de riesgo en los perros con garrapatas PCR positivas a *E. canis*, mediante regresión logística

Variable	Estrato	n	+	%	IC _%		RP	IC _{RP}		OR	IC _{OR}		P
					LI	LS		LI	LS		LI	LS	
Llenado capilar	≤ 2 s	121	6	5,0	6,2	79,5	8,6	2,7	7,5	14,4	2,6	79,3	0,002
	≥ 3 s	7	3	42,9	1,1	8,8							
Sospecha ehrlichiosis	No	111	7	6,3	-19,3	119,3	8,0	1,7	37,8	14,9	0,8	263,5	0,066
	Sí	2	1	50,0	1,8	10,8							
Tratamiento bajo sospecha	No	111	7	6,3	-19,3	119,3	8,0	1,7	37,8	14,9	0,8	263,5	0,066
	Sí	2	1	50,0	1,8	10,8							
Sexo del perro	Hembra	62	7	11,3	-1,1	7,2	0,3	0,1	1,2	0,3	0,1	1,23	0,088
	Macho	66	2	3,0	3,4	19,2							

n: Número de individuos **+**: Número de positivos **%:** Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato **RP:** Razón de Prevalencia **OR:** Odds Ratio **IC_%-IC_{RP}-IC_{OR}:** Intervalo de Confianza (95%) para cada grupo **LI:**Límite Inferior **LS:** Límite Superior **P:** Probabilidad para la Odds Ratio

Al analizar, mediante prueba de t-student, los valores hematológicos del grupo de perros con infección persistente (seropositivos y PCR positivos) contra los animales seronegativos y PCR negativos, se pudo establecer diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) en los valores de hematocrito, hemoglobina y eosinófilos, y diferencias significativas ($P < 0,05$) en los valores de leucocitos y linfocitos; los valores fueron menores en el grupo que presentó infección persistente.

La comparación del grupo de perros con infección pasada (seropositivos y PCR negativos) con perros negativos, estableció diferencias altamente significativas en los valores de hematocrito, hemoglobina y conteo plaquetario, y diferencias significativas en los valores de CHCM; el grupo con infección pasada mostró valores menores.

Al comparar el grupo de perros con infección aguda (seronegativos y PCR positivos) con el grupo de perros negativos, se estableció diferencias significativas en los valores de conteo plaquetario y linfocitos. Los valores de conteo plaquetario en el grupo con infección pasada fueron mayores y los valores de linfocitos fueron menores, el detalle se muestra en el Cuadro 24.

Cuadro 24. Análisis de valores hematológicos en los perros según los resultados obtenidos en las pruebas serológicas y moleculares a *E. canis*, mediante la prueba de t-student

Se	PCR	ID	Variable	n	Media	DES	DE	Variable	n	Media	DES	DE
-	-	a	Hematocrito	233	45,4	<u>c</u> , <u>d</u>	7,2	Segmentados	228	7245,0		9992,4
-	+	b		3	49,0	d	2,0		3	8662,7	7153,4	
+	-	c		100	40,9	<u>a</u> , <u>d</u> *	9,4		96	6193,1	2743,0	
+	+	d		7	34,9	<u>a</u> , <u>b</u> , <u>c</u> *	8,0		5	5217,4	3287,3	
-	-	a	Hemoglobina	228	15,0	<u>c</u> , <u>d</u>	2,6	Eosinófilos	228	1010,4	<u>d</u>	1555,4
-	+	b		3	16,0	d	1,9		3	897,0	870,3	
+	-	c		96	13,3	<u>a</u> ,	3,2		96	875,9	d	963,7
+	+	d		5	11,0	<u>a</u> , <u>b</u>	2,6		5	262,2	<u>a</u> , <u>c</u>	262,8
-	-	a	CHCM	228	33,0	c	2,3	Basófilos	228	18,3		153,3
-	+	b		3	33,3		2,9		3	-	-	
+	-	c		96	32,4	a	2,7		96	12,3	53,4	
+	+	d		5	32,6		2,3		5	-	-	
-	-	a	Trombocitos	216	220608,3	<u>b</u> , <u>c</u>	106388,0	Linfocitos	228	3387,8	<u>b</u> , <u>c</u> *, <u>d</u>	3438,2
-	+	b		3	368835,0	<u>a</u> , <u>c</u> , <u>d</u>	132175,6		3	2041,0	a	542,1
+	-	c		88	165324,5	<u>a</u> , <u>b</u>	88243,5		96	2897,3	a*	1711,0
+	+	d		5	142469,4	b	82756,0		5	1624,8	a	1005,8
-	-	a	Leucocitos	228	11312,5	<u>c</u> *, <u>d</u>	3833,4	Monocitos	228	230,2	c	301,7
-	+	b		3	11983,3		7938,3		3	158,3		139,6
+	-	c		96	10480,7	a*, <u>d</u> *	3839,3		96	168,6	a	213,9
+	+	d		5	7520,0	<u>a</u> , <u>c</u> *	3094,7		5	156,4		194,2
-	-	a	Bandas	228	229,8 ^a		386,9					
-	+	b		3	224,3 ^b		231,3					
+	-	c		96	219,4 ^c		245,7					
+	+	d		5	162,4 ^d		161,1					

Se: Serología **ID:** Identificación del grupo **n:** Número de individuos **DES:** Diferencia Estadísticamente Significativa contra otra media según literal (ID) **DE:** Desviación Estándar **Literales subrayados:** P<0,001 **Literales sin subrayar y sin símbolo *:** P<0,05 **Literales con símbolo *:** P=0,05-0,10

3.1. *Rickettsia* spp.

Los resultados descriptivos pertenecen al trabajo de Pacheco (2013). A partir de ellos, esta investigación realiza su análisis estadístico. Esta información se consigna en este apartado, para que el lector cuente con los insumos necesarios para su mejor comprensión.

Un total de 57 (14,3%) perros resultaron positivos en IFI. En tres (5,3%) casos se detectó anticuerpos contra *R. rickettsii* con títulos entre 1/128 y 1/256, en nueve casos (15,8%) contra *R. amblyommii* con títulos entre 1/32 y 1/256, y en 45 casos (78,9%) se determinaron títulos entre 1/32 y 1/256 contra diferentes especies de rickettsias (*R. amblyommii* y *R. rickettsii*), sin embargo, se clasificaron como *rickettsias* indefinidas -*Rickettsia* (R.i.)-, ya que no hubo diferencia de al menos cuatro títulos entre ellas (Cuadro 25).

Cuadro 25. Resultados de la IFI para *Rickettsia* spp.

Resultado	n=399	(%)	Títulos
Positivo	57	14,3	
<i>R. rickettsii</i>	3	5,3	1/128 a 1/256
<i>R. amblyommii</i>	9	15,8	1/32 a 1/256
<i>Rickettsia</i> (R.i.)	45	78,9	1/32 a 1/256
Negativo	342	85,7	
Total	399	100	

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

Se detectaron perros seropositivos en todos los parques, los mayores porcentajes se determinaron en los parques de Cañas (39,0%) y Agricultor (34,8%). Los perros seropositivos a *R. rickettsii* provenían de los parques de Cañas, La Paz e instalaciones recreativas del ITCR. En el Cuadro 26 se detalla la distribución geográfica de las muestras seropositivas para *Rickettsia* spp.

Del total de 130 *pooles* de garrapatas analizadas mediante PCR, 39 (30,0%) resultaron positivas a *Rickettsia* spp. De estos, 36 *pooles* correspondieron a *R. sanguineus* (25 hembras, siete machos y cuatro ninfas), un *pool* correspondió a *A. cajennense* (macho), uno a *A. ovale* (hembra) y

uno a *I. boliviensis* (hembra), encontradas sobre 38 perros. En ocho (22,2%) casos de garrapatas positivas (siete *R. sanguineus* y una *A. cajennense*); los perros de los que provenían también fueron seropositivos a especies indefinidas de *Rickettsia* (R.i.) (Cuadro 27).

Del total de 173 *pooles* de pulgas, 56 (32,3%) resultaron PCR positivas a *Rickettsia* spp (53 *C. felis* y tres *P. simulans*) encontradas sobre 56 perros (Cuadro 27). En cuatro (7,1%) casos de *C. felis* positivos, los perros de los que provenían también fueron seropositivos a especies indefinidas de *Rickettsia* (R.i.).

Cuadro 26. Seroprevalencia de *Rickettsia* spp. por provincias y parques

Provincia	Parque	Parque					Provincia	
		+/total (%)	(%) Global n=399	Total <i>R.r</i>	Total <i>R.a</i>	Total <i>R.i.</i>	+/total (%)	(%) Global n=399
San José	La Sabana	7/52 (13,5)	1,8	-	1	6	24/172 (14,0)	6,0
	La Paz	7/33 (21,2)	1,8	1	2	4		
	Desamparados	0/23 (-)	-	-	-	-		
	Aserrí	1/25 (4,0)	0,3	-	-	1		
	Barrio México	3/16 (18,8)	0,8	-	-	3		
	Ciudad Colón	6/23 (26,1)	1,5	-	-	6		
Alajuela	Agricultor	8/23 (34,8)	2,0	-	4	4	11/41 (26,8)	2,8
	La Fortuna	3/18 (16,7)	0,8	-	-	3		
Cartago	ITCR	4/35 (11,4)	1,0	1	1	2	4/35 (11,4)	1,0
Heredia	Monte de la Cruz	0/27 (-)	-	-	-	-	-	-
Limón	Guápiles	0/27 (-)	-	-	-	-	2/53 (3,8)	0,5
	Asís Esna-Vargas	2/26 (7,7)	0,5	-	-	2		
Guanacaste	Cañas	16/41 (39,0)	4,0	1	1	14	16/41 (39,0)	4,0
Puntarenas	Quebrada Ganado	0/30 (-)	-	-	-	-	-	-
Total		57/399 (14,3)	14,3	3	9	45	57/399 (14,3)	14,3

R.r: *R. rickettsii* **R.a:** *R. amblyommii* **R.i:** Rickettsias indefinidas **ITCR:** Instalaciones recreativas del Instituto Tecnológico de Costa Rica

Cuadro 27. Detección de *Rickettsia* spp. mediante PCR, en las garrapatas y pulgas recolectadas en los perros en estudio

Resultado	Garrapatas			Resultado	Pulgas	
	n=130	%	Estadio		n=173	%
Positivo	39	30,0		Positivo	56	32,3
<i>R. sanguineus</i>	36	92,3	25 H, 7 M, 4 N	<i>C. felis</i>	53	94,0
<i>A. cajemense</i>	1	2,6	1 M	<i>P. simulans</i>	3	6,0
<i>A. ovale</i>	1	2,6	1 H			
<i>I. boliviensis</i>	1	2,6	1 H			
Negativo	91	70,0		Negativo	108	62,4
Total	130	100		Total	173	100

H: Hembra M: Macho N: Ninfa

La mayoría de los perros con garrapatas PCR positivas a *Rickettsia* spp. se encontraron en los parques del Monte de la Cruz (100%), Guápiles (72,7%) y Quebrada Ganado (66,7%).

Los parques con mayor cantidad de pulgas PCR positivas a *Rickettsia* spp. fueron los de Aserri (100%), instalaciones recreativas del ITCR (100%), Monte de la Cruz (60%), La Fortuna (60%), Guápiles (54,5%) y Quebrada Ganado (44,4%). La distribución geográfica de los perros con garrapatas y pulgas PCR positivas a *Rickettsia* spp. se presenta en el Cuadro 28. No se encontró ADN de *Rickettsia* spp. en las muestras de piojos.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de los productos de la PCR, de cinco pulgas *C. felis* y ocho garrapatas *R. sanguineus*, confirmaron los resultados y determinaron una homología del 98-100% con *R. felis* cepas 2125 y California en pulgas, y *R. amblyommii* cepa GAT-30V en las garrapatas, depositadas en el Gen Bank (Pacheco, 2013)

La probabilidad de encontrar una garrapata PCR positiva, en perros seropositivos fue similar a la probabilidad de encontrarla en perros seronegativos, 29,1% y 31,5%, respectivamente.

Cuadro 28. Distribución de las garrapatas y pulgas detectadas positivas a *Rickettsia* spp. mediante PCR, según la ubicación geográfica de los parques

Provincia	Parque	Garrapatas		Pulgas	
		+/total (%)	(%) Global n=130	+/total (%)	(%) Global n=173
San José	La Sabana	0/9 (-)	-	2/13 (15,4)	1,2
	La Paz	0/3 (-)	-	2/13 (15,4)	1,2
	Desamparados	0/7 (-)	-	2/12 (16,7)	3,5
	Aserri	0/1 (-)	-	6/6 (100)	1,7
	Barrio México	0/4 (-)	-	3/15 (20)	1,7
	Ciudad Colón	3/9 (33,3)	2,3	3/8 (37,5)	
Alajuela	Agricultor	0/9 (-)	-	0/10 (-)	-
	La Fortuna	3/11 (27,3)	2,3	3/5 (60)	1,7
Cartago	ITCR	1/5 (20,0)	0,8	4/4 (100)	2,3
Heredia	Monte de la Cruz	2/2 (100)	1,5	15/25 (60)	8,7
Limón	Guápiles	8/11 (72,7)	6,2	6/11 (54,5)	3,5
	Asís Esna-Vargas	2/14 (14,3)	1,5	6/16 (37,5)	3,5
Guanacaste	Cañas	8/27 (29,6)	6,1	0/26 (-)	-
Puntarenas	Quebrada Ganado	12/18 (66,7)	9,2	4/9 (44,4)	2,3
Total		39/130 (30,0)	30,0	56/173 (32,4)	32,4

ITCR: Instalaciones recreativas del Instituto Tecnológico de Costa Rica

3.1.1. Análisis estadístico

Al comparar los valores hematológicos de los perros seropositivos y seronegativos a *Rickettsia* spp. mediante la prueba de t-student, se determinó una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) en los valores promedio de linfocitos y una diferencia significativa ($P < 0,05$) en los valores de leucocitos y eosinófilos (Cuadro 29).

Cuadro 29. Análisis de valores hematológicos en perros seropositivos y seronegativos a *Rickettsia* spp. mediante la prueba de t-student

Variable	General			Positivos			Negativos			P
	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	341	43,8	8,3	48	42,4	8,1	293	44,1	8,3	0,194
Hemoglobina	3330	14,4	2,9	48	14,1	2,6	282	14,5	3,0	0,380
CHCM	330	32,8	2,5	48	33,2	2,9	282	32,8	2,4	0,267
Trombocitos	313	204489,5	105471,7	45	184032,8	97795,4	268	207924,4	106492,7	0,160
Leucocitos	330	11075,5	3951,4	48	9761,5	2965,0	282	11299,1	4057,7	0,002
Bandas	330	223,1	347,4	48	194,8	203,0	282	228,0	366,4	0,365
Segmentados	330	6943,6	8480,1	48	6185,1	2408,9	282	7072,8	9116,5	0,170
Eosinófilos	330	978,2	1420,7	48	704,0	720,7	282	1024,9	1503,8	0,021
Basófilos	330	16,2	130,6	48	5,7	23,0	282	18,0	140,9	0,176
Linfocitos	330	3227,0	3022,2	48	2400,8	1325,5	282	3367,8	3203,7	0,001
Monocitos	330	208,5	275,9	48	247,7	248,5	282	202,0	280,2	0,289

n: Número de individuos **DE:** Desviación Estándar **LI:** **P:** Probabilidad calculada entre los grupos Positivos y Negativos **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

El análisis de los factores de riesgo de animales seropositivos a *Rickettsia* spp. estableció una asociación altamente significativa ($P < 0,001$) con la edad (∞) y con índices superiores al 2,1 de infestación con pulgas y una asociación significativa ($P < 0,05$), con la talla (∞), permanencia fuera del hogar e índice de infestación con garrapatas (∞). Se encontró una asociación débil ($P = 0,05-0,10$) con edema escrotal y anorexia. Se estableció como factores protectivos el sexo macho ($P < 0,05$) y raza pura ($P < 0,001$) (Cuadro 30).

Al comparar los valores hematológicos de los seropositivos y los seronegativos a *R. rickettsii*, no se estableció ninguna diferencia estadísticamente significativa, ni factores de riesgo. Se determinaron diferencias significativas para los valores hematológicos entre las muestras seropositivas y seronegativas a *R. amblyommii* en las variables hematocrito y hemoglobina (Cuadro 31). Tampoco se determinaron factores de riesgo. Entre las muestras seronegativas y seropositivas a especies de *Rickettsia* indefinidas (R.i.) se establecieron diferencias significativas ($P < 0,001$) en los valores promedio de leucocitos y linfocitos, diferencias significativas ($P < 0,05$) en los valores promedio de hematocrito, conteo plaquetario y eosinófilos, y diferencias leves

($P=0,05-0,10$) entre los valores promedio de hemoglobina. En todos los casos, los promedios de muestras positivas fueron menores (Cuadro 32).

Al analizar los factores de riesgo de perros seropositivos a *Rickettsia* (R.i.), mediante la prueba de regresión de Poisson, se encontró una asociación altamente significativa ($P<0,001$) con índices mayores a 2,1 de infestación de pulgas y una asociación significativa ($P<0,05$) con edad (∞), con membranas mucosas pálidas, con anorexia, con sangrados, con perros de talla mediana, con un diagnóstico previo de ehrlichiosis, presencia de ectoparásitos e índice de infestación con garrapatas (∞). Se encontró una diferencia débil ($P=0,05-0,10$) con permanencia de los perros fuera del hogar y con la presencia de más de cuatro humanos en su entorno. Se estableció como factores protectivos el sexo macho ($P<0,05$) y raza pura ($P<0,001$) (Cuadro 33).

Al analizar los valores hematológicos de los diferentes grupos de perros seropositivos a *R. rickettsii*, *R. amblyommii* y *Rickettsia* (R.i.) y del grupo de perros que resultó positivo a los tres agentes, se estableció para el grupo de *R. amblyommii*, diferencias significativas y diferencias débiles en los valores de hemoglobina y hematocrito, respectivamente. Los valores, en ambos casos, fueron mayores que los mostrados por el grupo seronegativo. Para el grupo *Rickettsia* (R.i.) se estableció diferencias altamente significativas en los valores de linfocitos y diferencias significativas en los valores de hematocrito, leucocitos y eosinófilos, y una diferencias débil en los valores de trombocitos, todos lo valores fueron menores que los seronegativos. Para el grupo *R. rickettsii* no se estableció ninguna diferencias con respecto a los seronegativos (Cuadro 34).

Cuadro 30. Análisis de los factores de riesgo en perros seropositivos a *Rickettsia* spp. mediante regresión de Poisson

Variable	Estrato	n	+	%	IC _%		RP	IC _{RP}		RR	IC _{RR}		P	P Wald
					LI	LS		LI	LS		LI	LS		
Edad (años)	0-1	204	15	7,4	5,5	9,2	2,8	1,6	5,0	2,8	1,5	5,2	< 0,001	0,003
	2-7	170	35	20,6	17,5	23,7								
	8-15	36	7	19,4	12,8	26,0								
Edema escrotal	No	406	55	13,5	1,0	99,0	3,7	1,3	10,1	3,7	0,9	15,1	0,070	
	Sí	4	2	50,0	10,2	16,9								
Anorexia	No	297	36	12,1	11,3	31,1	1,8	1,0	3,1	1,8	0,9	3,2	0,080	
	Sí	66	14	21,2	8,4	15,8								
Talla	Pequeño	97	6	6,2	3,7	8,6	2,6	1,2	5,9	2,6	1,1	6,1	0,027	0,066
	Mediano	305	49	16,1	14,0	18,2								
	Grande	8	2	25,0	9,7	40,3								
Permanencia Dentro/Fuera de la casa	Dentro	149	15	10,1	7,6	12,5	1,1	0,5	2,3	1,1	0,5	2,4	0,830	0,084
	Fuera/Dentro	91	10	11,0	7,7	14,3								
	Fuera	170	32	18,8	15,8	21,8								
Índice de infestación garrapatas	≤1	199	15	7,5	5,7	9,4	2,8	1,5	5,3	2,8	1,5	5,5	0,002	0,004
	1,1-2	98	21	21,4	17,3	25,6								
	≥2,1	113	21	18,6	14,9	22,2								
Índice de infestación pulgas	≤1	275	28	10,2	8,4	12,0	1,3	0,6	2,5	1,3	0,6	2,6	0,532	< 0,001
	1,1-2	78	10	12,8	9,0	16,6								
	≥2,1	57	19	33,3	27,1	39,6								
Sexo	Hembra	207	37	17,9	5,8	14,0	0,6	0,3	0,9	0,6	0,3	1,0	0,032	
	Macho	203	20	9,9	12,7	23,1								
Raza	SRD	191	39	20,4	4,6	11,9	0,4	0,2	0,7	0,4	0,2	0,7	0,001	
	Pura	219	18	8,2	14,7	26,1								

n: Número de individuos +: Número de positivos %: Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato RP: Razón de Prevalencia RR: Rate Ratio IC_%-IC_{RP}-IC_{RR}: Intervalo de Confianza (95%) para cada grupo LI: Límite Inferior LS: Límite Superior P: Probabilidad para la Rate Ratio P Wald: Probabilidad según test de Wald SRD: Sin Raza Definida

Cuadro 31. Análisis de los valores hematológicos en los perros seropositivos y seronegativos en IFI a *R. amblyommii* mediante la prueba de t-student

Variable	General			Positivos			Negativos			P
	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	341	43,8	8,3	7	49,4	5,4	334	43,7	8,3	0,070
Hemoglobina	330	14,4	2,9	7	16,3	1,1	323	14,4	2,9	0,003
CHCM	330	32,8	2,5	7	32,6	2,2	323	32,8	2,5	0,800
Trombocitos	313	204489,5	105471,7	7	240175,4	105280,5	306	203673,2	105506,6	0,367
Leucocitos	330	11075,5	3951,4	7	10900,0	3193,1	323	11079,3	3970,2	0,910
Bandas	330	223,1	347,4	7	269,4	278,3	323	222,2	349,0	0,722
Segmentados	330	6943,6	8480,1	7	6623,3	3080,6	323	6950,7	8561,4	0,801
Eosinófilos	330	978,2	1420,7	7	791,4	622,4	323	982,3	1433,3	0,468
Basófilos	330	16,2	130,6	7	9,4	25,0	323	16,3	131,9	0,570
Linfocitos	330	3227,0	3022,2	7	3031,3	1357,7	323	3231,4	3049,1	0,722

n: Número de individuos **DE:** Desviación Estándar **P:** Probabilidad calculada entre los grupos Positivos y Negativos **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

Cuadro 32. Análisis de los valores hematológicos en los perros seropositivos y seronegativos a *Rickettsia* (R.i.) mediante la prueba de t-student

Variable	General			Positivos			Negativos			P
	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	341	43,8	8,3	39	41,1	7,9	302	44,2	8,3	0,028
Hemoglobina	3330	14,4	2,9	39	13,6	2,5	291	14,5	2,9	0,080
CHCM	330	32,8	2,5	39	33,3	3,0	291	32,8	2,4	0,192
Trombocitos	313	204489,5	105471,7	36	171800,1	95256,1	277	208737,9	106146,7	0,048
Leucocitos	330	11075,5	3951,4	39	9507,7	2974,8	291	11285,6	4022,3	0,001
Bandas	330	223,1	347,4	39	182,3	189,4	291	228,7	363,3	0,215
Segmentados	330	6943,6	8480,1	39	6027,9	2326,3	291	7066,5	8985,9	0,109
Eosinófilos	330	978,2	1420,7	39	685,1	758,1	291	1017,6	1483,8	0,029
Basófilos	330	16,2	130,6	39	5,36	23,4	291	17,7	138,7	0,172
Linfocitos	330	3227,0	3022,2	39	2311,0	1337,1	291	3349,9	3162,3	0,001
Monocitos	330	208,5	275,9	39	267,3	261,5	291	200,7	277,3	0,158

n: Número de individuos **DE:** Desviación Estándar **P:** Probabilidad calculada entre los grupos Positivos y Negativos **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

Cuadro 33. Análisis de los factores de riesgo en los perros seropositivos a *Rickettsia* (R.i.) mediante regresión de Poisson

Variable	Estrato	n	+	%	IC%		RP	IC _{RP}		RR	IC _{RR}		P	P Wald
					LI	LS		LI	LS		LI	LS		
Edad (años)	0-1	204	13	6,4	4,7	8,1								0,020
	2-7	170	25	14,7	12,0	17,4	2,3	1,2	4,4	2,3	1,2	4,5	0,015	
	8-15	36	7	19,4	12,8	26,0	3,1	1,3	7,1	3,1	1,2	7,7	0,017	
Membranas	Rosadas	357	34	9,5	8,0	11,1								0,080
Mucosas	Pálidas	48	10	20,8	15,0	26,7	2,2	1,2	4,1	2,5	1,1	5,5	0,022	
	Muy pálidas	5	1	20,0	2,1	37,9	2,1	0,4	12,5	2,4	0,3	21,9	0,445	
Anorexia	No	297	26	8,8	8,9	27,5								0,036
	Sí	66	12	18,2	5,5	12,0	2,0	1,1	3,9	2,1	1,1	4,1		
Sangrados	No	343	33	9,6	6,0	44,0								0,047
	Sí	20	5	25,0	6,5	12,7	2,6	1,1	5,9	2,6	1,1	6,7		
Talla	Pequeño	97	4	4,1	2,1	6,1								0,088
	Mediano	305	40	13,1	11,2	15,0	3,2	1,2	8,7	3,2	1,1	8,9	0,027	
	Grande	8	1	12,5	0,8	24,2	3,0	0,4	24,0	3,0	0,3	27,1	0,321	
Permanencia	Dentro	149	12	8,1	5,8	10,3								0,092
	Dentro/Fuera	91	7	7,7	4,9	10,5	1,0	0,4	2,3	1,0	0,4	2,4	0,923	
	Fuera	170	26	15,3	12,5	18,1	2,0	1,0	3,6	1,9	1,0	3,8	0,066	
Cantidad de humanos	0	42	7	16,7	10,9	22,4								0,217
	1-3	263	31	11,8	9,8	13,8	0,7	0,3	1,5	0,7	0,3	1,6	0,408	
	≥4	105	7	6,7	4,2	9,1	0,4	0,2	1,0	0,4	0,1	1,1	0,087	
Diagnóstico ehrlichiosis	No	359	35	9,7	2,5	64,1								0,041
	Sí	9	3	33,3	6,7	12,8	3,4	1,3	9,1	3,4	1,1	11,2		
Índice de infestación garrapatas	≤1	199	11	5,5	3,9	7,1								0,008
	1,1 - 2	98	15	15,3	11,7	18,9	2,8	1,3	5,8	2,8	1,3	6,0	0,010	
	≥2,1	113	19	16,8	13,3	20,3	3,0	1,5	6,2	3,0	1,4	6,4	0,003	
Índice de infestación pulgas	≤1	275	22	8,0	6,4	9,6								< 0,001
	1,1 - 2	78	6	7,7	4,7	10,7	1	0,4	2,3	1,0	0,4	2,4	0,932	
	≥2,1	57	17	29,8	23,8	35,9	3,7	2,1	6,6	3,7	2,0	7,0	< 0,001	
Sexo	Hembra	207	32	15,5	3,0	9,8								0,007
	Macho	203	13	6,4	10,5	20,4	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2	0,8		
Raza	SRD	191	32	16,8	2,8	9,1								0,002
	Pura	219	13	5,9	11,5	22,1	0,4	0,2	0,7	0,4	0,2	0,7		

n: Número de individuos +: Número de positivos %: Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato RP: Razón de Prevalencia RR: Rate Ratio IC%-IC_{RP}-IC_{RR}: Intervalo de Confianza (95%) para cada grupo LI:Límite Inferior LS: Límite Superior P: Probabilidad para la Rate Ratio P Wald: Probabilidad según test de Wald SRD: Sin Raza Definida

Al analizar los factores de riesgo asociados con perros con garrapatas PCR positivas a *Rickettsia* spp., se determinó una asociación significativa (P<0,05) con la raza pura y se determinó como factor protector al tratamiento contra infestación de pulgas (P=0,05-0,10). En perros con pulgas PCR positivas se estableció una asociación altamente significativa (P<0,001) con la raza

pura, y una asociación significativa ($P < 0,05$) con alta presencia de personas en su entorno (∞). Se estableció como factores protectivos el estatus de deambulaci3n de los perros ($P < 0,001$), su permanencia fuera de la casa ($P < 0,05$) y el sexo macho ($P = 0,05-0,10$) (Cuadro 35).

3.2. An3lisis estadístico de la seropositividad mixta

En 26 casos se determinaron muestras seropositivas a *Rickettsia* spp. y seropositivas a *E. canis*; de estos, 23 eran seropositivos a especies indefinidas de *Rickettsia* (R.i.) y tres seropositivos a *R. amblyommi*.

En dos casos, las muestras fueron seropositivas a *Rickettsia* spp. -*Rickettsia* (R.i.)-, y fueron, a su vez, PCR positivas y seropositivas a *E. canis*. En un caso se determin3n una muestra seropositiva a *R. amblyommi*, PCR positiva y seropositiva a *E. canis* (no hubo an3lisis hematol3gico para esta muestra). No se determinaron muestras positivas a *R. rickettsii* y *E. canis* en infecci3n mixta.

El an3lisis estadístico de valores hematol3gicos, de perros seropositivos a *E. canis* y *Rickettsia* spp. determin3n una diferencia altamente significativa con respecto a los negativos, en el valor de hematocrito, diferencias significativas en los valores de hemoglobina, leucocitos, neutr3filos segmentados y linfocitos. Con respecto a los positivos, solo a *E. canis*, se determinaron diferencias significativas en el valor de leucocitos y una diferencia d3bil en el valor de monocitos. Con respecto a los positivos, solo a *Rickettsia* spp., se determinaron diferencias significativas en los valores de hematocrito, hemoglobina y neutr3filos segmentados (Cuadro 36).

El an3lisis estadístico de valores hematol3gicos, de perros seropositivos a *E. canis* y *R. amblyommi* no determin3n diferencias significativas con respecto a otro grupo, fuera negativos o de infecci3n simple (Cuadro 37).

Entre aquellas muestras que resultaron seropositivas a *E. canis* y *Rickettsia* (R.i.) y los negativos, se determinaron diferencias altamente significativas en los valores de hematocrito, hemoglobina y trombocitos. Además, entre estas y los seropositivos, solo a *E. canis*, se establecieron diferencias significativas en los valores de leucocitos, neutrófilos segmentados y monocitos. Por último, en comparación con los seropositivos solamente a *Rickettsia* (R.i.), se detectó una diferencia altamente significativa en el valor de hematocrito, diferencias significativas en los valores de neutrófilos en bandas y neutrófilos segmentados, y una diferencia débil en el valor de hemoglobina (Cuadro 38).

Cuadro 34. Análisis de los valores hematológicos en los perros seropositivos a *R. rickettsii*, *R. amblyommii* y *Rickettsia* (R.i.) mediante la prueba de t-student

<i>R.r</i>	<i>R.a</i>	R.i.	ID	Variable	n	Media	DES	DE	Variable	n	Media	DES	DE
-	-	-	a	Hematocrito	293	44,1	<i>b,c*</i>	8,3	Segmentados	282	7072,8		9116,5
-	-	+	b		39	41,1	<i>a,c</i>	7,9		39	6027,9		2326,3
-	+	-	c		7	49,4	<i>a*,b</i>	5,4		7	6623,3		3080,6
+	-	-	d		2	43,0		8,5		2	7717,0		1769,5
-	-	-	a	Hemoglobina	282	14,5	<i>c</i>	3,0	Eosinófilos	282	1024,9	<i>b</i>	1503,8
-	-	+	b		39	13,6	<i>c</i>	2,5		39	685,1	<i>a</i>	758,1
-	+	-	c		7	16,3	<i>a,b</i>	1,1		7	791,4		622,4
+	-	-	d		2	14,5		4,0		2	767,0		1769,5
-	-	-	a	CHCM	282	32,8		2,4	Basófilos	282	18,0		140,9
-	-	+	b		39	33,3		3,0		39	5,4		23,4
-	+	-	c		7	32,6		2,2		7	9,4		25,0
+	-	-	d		2	33,0		2,7		0	-		
-	-	-	a	Trombocitos	268	207924,4	<i>b*</i>	106492,7	Linfocitos	282	3367,8	<i>b</i>	3203,7
-	-	+	b		36	171800,1	<i>a*,c*</i>	95256,1		39	2311,0	<i>a</i>	1337,1
-	+	-	c		7	240175,4	<i>b*</i>	105280,5		7	3031,3		1357,7
+	-	-	d		2	207722,0		90308,9		2	1946,5		249,6
-	-	-	a	Leucocitos	282	11299,1	<i>b</i>	4057,7	Monocitos	282	202,0		280,2
-	-	+	b		39	9507,7	<i>a</i>	2974,8		39	267,3		261,5
-	+	-	c		7	10900,0		3193,1		7	175,6		178,3
+	-	-	d		2	10725,0		1520,3		2	118,0		166,9
-	-	-	a	Bandas	282	228,0		366,4					
-	-	+	b		39	182,3		189,4					
-	+	-	c		7	269,4		278,3					
+	-	-	d		2	177,0		250,3					

R.r: *Rickettsia rickettsii* **R.a:** *Rickettsia amblyommii* **R.i.:** *Rickettsias* indefinidas **ID:** Identificación del grupo **n:** Número de individuos **DES:** Diferencia Estadísticamente Significativa contra otra media según literal (ID) **DE:** Desviación Estándar **Literales subrayados:** P<0,001 **Literales sin subrayar y sin símbolo *:** P<0,05 **Literales con símbolo *:** P=0,05-0,10

Cuadro 35. Análisis de los factores de riesgo en los perros con garrapatas y pulgas PCR positivas a *Rickettsia* spp. mediante regresión de Poisson

Ectoparásito	Variable	Estrato	n	+	%	IC%		RP	IC _{RP}		RR	IC _{RR}		P	P Wald	
						LI	LS		LI	LS		LI	LS			
Garrapatas	Raza	SRD	73	21	28,8	18,7	43,1									
		Pura	55	17	30,9	18,4	39,2	1,1	0,6	1,8	1,2	1,0	1,4	0,035		
	Tratamiento contra pulgas	No	41	18	43,9	11,5	31,5									
		Sí	65	14	21,5	28,7	59,1	0,5	0,3	0,9	0,4	0,6	0,8	0,016		
Pulgas	Raza	SRD	10	31	31,0	27,1	51,0									
		Pura	64	25	39,1	21,9	40,1	1,3	0,8	1,9	1,4	1,2	1,6	< 0,001		
	Cantidad de personas	0	28	8	28,6	20,0	37,1									0,001
		1-3	95	35	36,8	31,9	41,8	1,3	0,7	2,5	1,7	1,2	2,4	0,002		
		≥4	41	13	31,7	24,4	39,0	1,1	0,5	2,3	1,6	1,1	2,3	0,008		
	Sexo	Hembra	69	25	36,2	23,2	42,1									
		Macho	95	31	32,6	24,9	47,6	0,9	0,6	1,4	0,9	0,7	1,0	0,053		
	Estatus	Con Propietario	13	48	36,1	10,4	41,2									
		Deambulante	31	8	25,8	27,9	44,3	0,7	0,4	1,4	0,6	0,4	0,8	< 0,001		
Permanencia Dentro/Fuera	Dentro	49	21	42,9	35,8	49,9									0,006	
	Fuera/Dentro	29	10	34,5	25,7	43,3	0,8	0,4	1,5	1,0	0,8	1,3	0,802			
	Fuera	86	25	29,1	24,2	34,0	0,7	0,4	1,1	0,8	0,6	0,9	0,006			

n: Número de individuos **+**: Número de positivos **%:** Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato **RP:** Razón de Prevalencia **RR:** Rate Ratio **IC%-IC_{RP}-IC_{RR}:** Intervalo de Confianza (95%) para cada grupo **LI:**Límite Inferior **LS:** Límite Superior **P:** Probabilidad para la Rate Ratio **P Wald:** Probabilidad según test de Wald **SRD:** Sin Raza Definida

Cuadro 36. Análisis de valores hematológicos en seropositividad mixta de *Rickettsia* spp. y *E. canis* mediante la prueba de t-student según los resultados serológicos

<i>R.spp</i>	<i>E. c</i>	ID	Variable	n	Media	DE	DES	Variable	n	Media	DE	DES
-	-	a	Hematocrito	209	45,3	7,3	<u>b,d</u>	Segmentados	204	7327,0	10559,9	<i>d</i>
-	+	b		84	40,8	9,8	<u>a,c</u>		78	6408,2	2949,4	
+	-	c		24	45,4	7,1	<i>b,d</i>		24	6855,8	2490,8	<i>d</i>
+	+	d		23	39,3	8,1	<u>a,c</u>		23	5372,9	2104,1	<i>a,c</i>
-	-	a	Hemoglobina	204	15,0	2,6	<u>b,d</u>	Eosinófilos	204	1054,8	1625,7	<i>c</i>
-	+	b		78	13,1	3,4	<u>a,c</u>		78	946,9	1129,7	
+	-	c		24	14,9	2,1	<i>b,d</i>		24	675,6	590,0	<i>a</i>
+	+	d		23	13,1	2,8	<i>a,c</i>		23	740,4	861,6	
-	-	a	CHCM	204	33,0	2,4	<i>b</i>	Basófilos	204	19,8	161,8	
-	+	b		78	32,1	2,4	<i>a</i>		78	13,1	58,0	
+	-	c		24	32,7	2,1			24	4,9	24,1	
+	+	d		23	33,5	3,4			23	6,8	22,9	
-	-	a	Trombocitos	197	224656,1	107268,4	<u>b,c</u>	Linfocitos	204	3519,5	3601,8	<i>b*,c,d</i>
-	+	b		71	161499,9	89802,9	<u>a</u>		78	2970,9	1741,8	<i>a*,c</i>
+	-	c		22	200120,8	111583,5	<i>a</i>		24	2299,6	1035,0	<u>a,b</u>
+	+	d		22	172473,2	81878,5			23	2444,0	1589,5	<i>a</i>
-	-	a	Leucocitos	204	11472,6	3970,5	<i>d</i>	Monocitos	204	222,5	303,6	<i>b</i>
-	+	b		78	10845,5	4270,4	<i>d</i>		78	148,1	199,1	<i>a,c*,d*</i>
+	-	c		24	10295,8	2925,9			24	238,8	250,6	<i>b*</i>
+	+	d		23	9032,6	2873,9	<i>a,b</i>		23	244,0	249,1	<i>b*</i>
-	-	a	Bandas	204	235,0	403,3						
-	+	b		78	209,9	246,4						
+	-	c		24	169,2	190,7						
+	+	d		23	230,0	215,1						

R. spp: *Rickettsia* spp. **E.c:** *E. canis* **ID:** Identificación del grupo **n:** Número de individuos **DES:** Diferencia Estadísticamente Significativa contra otra media según literal (ID) **DE:** Desviación Estándar **Literales subrayados:** P<0,001 **Literales sin subrayar y sin símbolo *:** P<0,05 **Literales con símbolo *:** P=0,05-0,10

Cuadro 37. Análisis de valores hematológicos en seropositividad mixta de *R. amblyommii* y *E. canis* mediante la prueba de t-student según los resultados serológicos

<i>R.a</i>	<i>E. c</i>	ID	Variable	n	Media	DE	DES	Variable	n	Media	DE	DES
-	-	a	Hematocrito	228	45,2	7,2	<u>b,c</u> *	Segmentados	223	7288,2	10123,7	
-	+	b		105	40,4	9,5	<u>a,c</u>		99	6172,1	2785,0	
+	-	c		5	51,4	4,5	<u>a*,b</u>		5	6797,0	2751,2	
+	+	d		2	44,5	5,0			2	6189,0	5112,4	
-	-	a	Hemoglobina	223	14,9	2,6	<u>b,c</u>	Eosinófilos	223	1019,5	1567,1	
-	+	b		99	13,1	3,3	<u>a,c</u>		99	902,8	1084,2	
+	-	c		5	16,8	0,7	<u>a,b</u>		5	806,8	742,9	
+	+	d		0	-	-			2	753,0	335,2	
-	-	a	CHCM	223	33,0	2,4	<u>b</u>	Basófilos	223	18,7	155,0	
-	+	b		99	32,4	2,8	<u>a</u>		99	11,3	52,3	
+	-	c		5	32,2	1,9			0	-	-	
+	+	d		2	33,5	3,7			2	33,0	46,7	
-	-	a	Trombocitos	214	222661,5	108074,7	<u>b</u>	Linfocitos	223	3396,6	3473,9	<u>b*</u>
-	+	b		91	160329,9	84652,3	<u>a</u>		99	2853,2	1732,2	<u>a*</u>
+	-	c		5	202070,6	98379,5			5	3147,0	1641,1	
+	+	d		2	335437,5	48786,8			2	2742,0	229,1	
-	-	a	Leucocitos	223	11348,4	3907,3	<u>b*</u>	Monocitos	223	223,8	300,5	<u>b*</u>
-	+	b		99	10446,5	4070,2	<u>a*</u>		99	173,4	214,8	<u>a*</u>
+	-	c		5	11360,0	3067,0			5	245,8	161,5	
+	+	d		2	9750,0	4454,8			0	-	-	
-	-	a	Bandas	223	225,0	388,7						
-	+	b		99	218,1	239,7						
+	-	c		5	364,0	276,7						
+	+	d		2	33,0	46,8						

R.a: *R. amblyommii* **E.c:** *E. canis* **ID:** Identificación del grupo **n:** Número de individuos **DES:** Diferencia Estadísticamente Significativa contra otra media según literal (ID) **DE:** Desviación Estándar **Literales subrayados:** P<0,001 **Literales sin subrayar y sin símbolo *:** P<0,05 **Literales con símbolo *:** P=0,05-0,10

Cuadro 38. Análisis de valores hematológicos en seropositividad mixta de *Rickettsia* (R.i.) y *E. canis* mediante la prueba de t-student según los resultados serológicos

R.i.	E. c	ID	Variable	n	Media	DE	DES	Variable	n	Media	DE	DES
-	-	a	Hematocrito	216	45,5	7,3	<u>b,d</u>	Segmentados	211	7318,1	10390,4	d
-	+	b		86	40,9	9,7	<u>a</u>		80	6402,7	2968,3	d
+	-	c		17	43,9	7,0	<u>d</u>		17	6771,8	2594,1	d
+	+	d		21	38,8	8,3	<u>a,c</u>		21	5295,2	1868,2	a,b,c
-	-	a	Hemoglobina	211	15,0	2,6	<u>b,d</u>	Eosinófilos	211	1046,2	1602,6	c
-	+	b		80	13,2	3,3	<u>a,c*</u>		80	942,1	1116,4	
+	-	c		17	14,4	2,0	<u>b*,d*</u>		17	626,3	585,2	a
+	+	d		21	13,0	2,9	<u>a,c*</u>		21	739,2	900,6	
-	-	a	CHCM	211	33,0	2,4	b	Basófilos	211	19,2	159,1	
-	+	b		80	32,1	2,4	a,		80	13,6	57,6	
+	-	c		17	32,8	2,1			17	6,9	28,6	
+	+	d		21	33,5	3,4			21	4,3	19,9	
-	-	a	Trombocitos	204	223936,5	106562,1	<u>b,d</u>	Linfocitos	211	3495,8	3552,2	<u>b*,c,d</u>
-	+	b		73	166265,3	93225,4	<u>a</u>		80	2965,2	1720,2	<u>a*,c</u>
+	-	c		15	198457,3	123757,4			17	2091,9	759,7	<u>a,b</u>
+	+	d		20	156176,8	64880,2	<u>a</u>		21	2415,7	1663,3	a
-	-	a	Leucocitos	211	11462,8	3928,8	d	Monocitos	211	222,1	299,7	b
-	+	b		80	10818,1	4249,2	d		80	144,4	197,9	a,d
+	-	c		17	9932,4	3048,5			17	250,9	282,9	
+	+	d		21	8964,3	2834,9	a,b		21	267,2	248,5	b
-	-	a	Bandas	211	237,5	399,3	c					
-	+	b		80	205,4	244,9	c					
+	-	c		17	111,0	117,3	a,b,d					
+	+	d		21	248,8	215,7	c					

R.i.: especies indefinidas de *Rickettsia* **E.c:** *E. canis* **ID:** Identificación del grupo **n:** Número de individuos **DES:** Diferencia Estadísticamente Significativa contra otra media según literal (ID) **DE:** Desviación Estándar **Literales subrayados:** P<0,001 **Literales sin subrayar y sin símbolo *:** P<0,05 **Literales con símbolo *:** P=0,05-0,10

4. DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio transversal, que combina las técnicas diagnósticas de la ICM, IFI, PCR y secuenciación molecular, para la detección de diferentes especies de *Ehrlichia* circulantes en perros que visitan parques recreativos de todas las regiones socioeconómicas de Costa Rica. Es también, el primer estudio transversal, que combina las técnicas diagnósticas ya mencionadas, para el estudio de rickettsias, en perros que visitan parques recreativos en Costa Rica. Los valores de seroprevalencia y prevalencia obtenidos en el presente estudio reflejan además, la presencia y distribución de estos dos agentes patógenos en perros. Finalmente, es el primer estudio en el país que realiza un análisis de los hallazgos hemopatológicos producto de las infecciones y los factores de riesgo asociados a seropositividad y resultados PCR positivos en sangre y ectoparásitos para *E. canis* y *Rickettsia* spp.

4.1. Ectoparásitos

Un 54,0% (238/441) de los perros estaba infestado con algún ectoparásito: 69,3% (165/238) de ellos estaba infestado con pulgas, 53,4% (127/238) con garrapatas, y un 2,1% (5/238) con piojos; sin embargo, la cantidad de garrapatas recolectada fue mayor a la de pulgas.

Un 28,8% (127/441) del total de los perros tenía garrapatas (Guanacaste: 62,8%, Puntarenas: 56,3%, Limón: 46,3%, Alajuela: 44,4%, San José: 16,7%, Cartago: 12,8% y Heredia 6,6%) Previamente, se había reportado un 35% (51/146) de infestación sobre perros de Guanacaste, Limón, Puntarenas y Alajuela (Rojas et al. 2014) y un 31,3% (26/83) de infestación sobre los perros en hogares de Limón (Trovo et al. 2012). Los porcentajes de infestación más altos se determinaron en el presente estudio en parques fuera de la Gran Área Metropolitana (GAM), en

Cañas (62,8%), La Fortuna (61,1%), Quebrada Ganado (56,3%) y Limón (46,3%). Esto puede deberse a una combinación de factores dentro de los que se destaca una atención veterinaria menor en esta zona, comparada con la que existe dentro de la GAM.

La garrapata predominante fue *R. sanguineus*, encontrada en 119/127 (93,7%) de los perros infestados con garrapatas, lo que concuerda con reportes anteriores (Álvarez et al. 2006; Ábrego 2008; Troyo et al. 2012; Rojas et al. 2014). La especie *R. sanguineus* ha sido reportada como la más común en perros de Costa Rica y en perros en zonas domésticas en el mundo (Álvarez et al. 2006; Ábrego 2008; Dantas-Torres 2008b).

La segunda garrapata en número detectada sobre perros en el presente estudio fue *A. ovale* (4,7%; 6/127), la cual fue encontrada en San José (en los parques de La Sabana, La Paz y Ciudad Colón); en Alajuela (en el parque de La Fortuna) y Puntarenas (en el parque de Quebrada Ganado), lo que concuerda con datos previamente publicados, que ubicaron estas garrapatas en Escazú y Mora, Kéköldi, Guácimo, Jiménez y Guápiles (Álvarez et al. 2006; Troyo et al. 2012; Rojas et al. 2014). Esta garrapata se encuentra, generalmente, en ambientes cercanos a bosques (Fairchild et al.1996; Onofrio et al. 2006).

Con respecto a *A. cajennense*, se encontró en un 1,6% (2/127) de los perros infestados con garrapatas. Los dos perros infestados con esta garrapata provenían de Cañas y mostraron infestación concomitante con *R. sanguineus*. Previamente, Álvarez et al. (2006) habían reportado a *A. cajennense* en infestación mixta pero en la zona del oeste de San José.

A. maculatum e *I. boliviensis* se encontraron infestando a un perro (0,78%; 1/127) en La Fortuna, Alajuela y a un perro en el Monte de la Cruz, Heredia, respectivamente. *A. maculatum* había sido reportada anteriormente en Alajuela (Álvarez et al. 2005), mientras que de *I. boliviensis*

se tiene registros de su presencia en Cartago, Guanacaste y Puntarenas (Álvarez et al. 2005), pero no en Heredia, donde fue hallada en este estudio.

Un 37,4% (165/441) de los perros estaban infestados con pulgas (Heredia: 66,6%, Guanacaste: 60,5%, Limón: 50,0%, San José: 33,3%, Alajuela: 31,1%, Puntarenas: 28,1% y Cartago: 10,3%). Anteriormente, se había determinado un 83% (69/83) de los hogares con perros infestados con pulgas en la zona caribeña de Costa Rica (Trovo et al. 2012); sin embargo, este es el primer estudio que logra recabar la información sobre la frecuencia de las especies de pulgas presentes sobre perros en todo el territorio costarricense.

La pulga predominante en los perros que visitaron parques recreativos fue *C. felis* (97,6%; 161/165), esto concuerda con lo encontrado en la zona atlántica, en donde un 100% (69/69) de las casas tenían un perro infestado con esta pulga. En el presente estudio, específicamente en Limón, se encontró un 92,6% (25/27) de infestación con *C. felis*.

P. simulans se encontró en un 5,5% (9/165) de los perros estudiados, en infestación simple, como también en infestación concomitante con *C. felis*. Esta pulga se detectó sobre todo en perros que visitaron el Monte de la Cruz en Heredia y los que visitaron los parques de Limón; aunque estos hallazgos no concuerdan con Trovo et al. (2012), que reportaron a esta pulga en un 69,6% (48/69) de perros de hogares de la zona atlántica.

Sobre la infestación de perros en Costa Rica con *E. gallinacea* no existen reportes hasta la fecha. Este hallazgo parece accidental, ya que son las aves los hospedadores regulares para esta pulga, sin embargo, Escobar et al. (2011) reportaron infestación de perros en Guatemala con esta pulga.

Se encontraron piojos en un 1,3% de los perros (3/441), en un 11% (3/27) de los casos se encontró *H. spiniger* y en un 3,7% (1/27) *T. canis*, todos los piojos se detectaron en los parques en

Limón. Los porcentajes de piojos reportados por Troyo et al. (2012) en la zona atlántica fueron 13,3% (11/83) para *H. spiniger* y 9,6% (8/83) para *T. canis*.

4.2. Ehrlichia canis

El estudio transversal determinó una seroprevalencia nacional de 32,1% (131/408), con rangos entre 3,7% al 70,7% en los diferentes parques. El porcentaje nacional de seropositividad contrasta con el porcentaje obtenido por Rímolo (2006) del 70% (21/30), debido, probablemente, a que Rímolo estudió a una población canina sospechosa de sufrir ehrlichiosis, por consiguiente, encontró más perros seropositivos. Otros estudios en América han determinado seroprevalencias con porcentajes variados, por ejemplo, 82,4% (75/91) en Colombia, 70,9% (227/320) en Brasil y 44,1% (53/120) en México (Rodríguez-Vivas et al. 2005; Melo et al. 2011; Vargas- Hernández et al. 2012), además de 35,6% (168/472) y 16,6% (21/129) en Brasil; y 0,8% (69/8662) en los EE.UU. (Souza et al. 2010; Beall et al. 2012; Spolidorio et al. 2013).

En la GAM, se determinó una seroprevalencia de 25,8% (68/264), en contraste con 44,1% (63/143) en el resto de las zonas geográficas periféricas (perros no provenientes de la GAM) estableciéndose una asociación significativa entre seropositividad a *E. canis* con perros no provenientes de la GAM ($P < 0,05$; RR:1,7; Min: 1,2 Máx: 2,4).

En el parque de Cañas se encontró la mayor cantidad de perros positivos a *E. canis* (70,7%, 29/41), además, se detectó la mayor cantidad de garrapatas sobre perros (135). Como la infección con la bacteria depende de la transmisión por garrapatas infectadas, en lugares donde se encuentre mayor número de garrapatas por perro (índice de infestación), habrá mayor probabilidad de encontrar perros seropositivos a *E. canis*, lo cual se confirmó además, en el análisis de los factores de riesgo asociados a seropositividad y positividad en PCR a *E. canis*. Esto también concuerda

con el hecho de que en ese parque (Cañas) se identificara la mayor cantidad de garrapatas PCR positivas (18,5%; 5/27) y la mayor cantidad de perros PCR positivos a *E. canis* (9,8%; 4/41), en comparación con otras regiones estudiadas, estableciéndose una alta circulación de este agente en esta zona. El Parque de Quebrada Ganado fue el segundo parque con más perros seropositivos (63,3%, 19/30) y garrapatas PCR positivas 11,1% (2/18), seguido del Parque de Guápiles con 33,3% (9/27) perros seropositivos, además de 7,4% (2/27) de perros PCR positivos y 9,1% (1/11) de garrapatas PCR positivas. Se puede concluir que las diferencias en las seroprevalencias detectadas en los diversos parques recreativos, así como la presencia de *E. canis* en sangre de perros y sus garrapatas, está influenciado por la zona geográfica, siendo las regiones menos urbanizadas, las que tuvieron mayor seropositividad y circulación de *E. canis*; y dependiendo de factores como la disponibilidad del vector, la cantidad de perros por casa (índice poblacional) y la cantidad de garrapatas por perro (índice de infestación), así variarán los porcentajes de seropositividad y positividad a PCR en sangre y garrapatas. Estos factores se determinaron, en el presente estudio, como factores de riesgo asociados a seroprevalencia y perros PCR positivos a *E. canis*.

Los índices poblacionales determinados en este estudio fueron mucho más altos que los reportados por List (2009); 2,6 perros por vivienda en las zonas fuera de la GAM y 2,0 perros por vivienda dentro de la GAM. Este índice y el hecho de que la garrapata predominante fuera *R. sanguineus*, podría explicar también, por qué en las zonas periurbanas se encontró mayor presencia de *E. canis*.

R. sanguineus tiene predilección por los perros, y existiendo mayor concentración de perros en estas zonas, era de esperar que se diera una mayor probabilidad de transmisión de *E. canis*. En este sentido, Álvarez et al. (2005) señalan a *R. sanguineus* como una garrapata con

predilección por zonas peridomésticas, mientras que Labruna y Pereira (2001) reportan la adaptación de esta garrapata más bien, a ambientes urbanos y peridomésticos que a vegetación abierta, por su preferencia hacia los perros.

Asimismo, en un 49,7% de los perros en las zonas periurbanas existe infestación con garrapatas, mientras que en las zonas urbanas, solamente un 18,0% de los perros tenían garrapatas. Es necesario investigar las razones de esta variación en los porcentajes de infestación, para determinar si existen relaciones con el clima, el tipo de vegetación, factores socioeconómicos como la actividad productiva predominante o la atención veterinaria y el cuidado que le brindan los propietarios a sus mascotas.

El único lugar que presentó altos porcentajes de seropositividad a *E. canis* dentro de la GAM fue Ciudad Colón. Aquí, los resultados obtenidos fueron similares a los de las zonas periurbanas (56,5% de seropositividad, 36,0% de perros con infestación de garrapatas). Se hipotetiza, que esta zona tiene condiciones de clima y vegetación muy similares a otras zonas periurbanas fuera de la GAM que podrían estar influyendo en el alto porcentaje de seropositividad.

El ADN de *E. canis* se encontró en un 3,2% (13/407) de las sangres de perros analizadas. Los porcentajes de positividad a la PCR fueron muy bajos, comparados con los porcentajes que obtuvo Romero en el 2008 (47,7%), esto se debe, posiblemente, a que Romero analizó una población sospechosa de sufrir ehrlichiosis y por lo tanto, existía una mayor probabilidad de encontrar la bacteria en esos perros, en contraste con el presente estudio, en donde la población que se analizó fue, en su mayoría, perros que no presentaban manifestaciones clínicas que sugirieran infección con ehrlichiosis.

Estos resultados también contrastan con los de Rojas et al. (2014) que determinaron un 34% de perros PCR positivos a *E. canis*; sin embargo, el grupo de perros que analizaron provenía

de una población con poca asistencia veterinaria y fuera de la GAM. Romero (2008) determinó que Alajuela era la zona con mayor porcentaje de positividad a *E. canis* (37,8%, 56/103), por haber sido esta, la provincia con mayor participación en el estudio. En el presente estudio, Alajuela también representó la zona con mayor cantidad de perros PCR positivos (8,7%, 2/23), la segunda zona con más garrapatas PCR positivas (11,1%, 1/9) y la segunda zona más seroprevalente (34,8%, 8/23) de la GAM, después de Ciudad Colón.

El ADN de *E. canis* se detectó en un 6,9% (9/130) de las garrapatas analizadas. Anteriormente, se había determinado un 26,0% de garrapatas *R. sanguineus* PCR positivas a *E. canis* (Ábrego, 2008), mientras que Souza et al. (2010) determinaron un 21,9% (7/32) de garrapatas *R. sanguineus* infectadas con *E. canis* en Brasil.

La diferencia entre la seroprevalencia (32,2%) y la prevalencia por PCR (3,2%) obtenidas en el presente estudio, concuerdan con otras investigaciones realizadas en Brasil, como la de Tanikawa et al. (2013), que reportaron una seroprevalencia de *E. canis* del 69,4% (75/108) y un porcentaje de positividad a *E. canis* en sangre de 3,7% (4/108). Otros estudios moleculares realizados en otros países de América, reportan prevalencias tan altas como del 40,6% (37/91) en Colombia y 15,0% (48/320) hasta 0% (0/199) en Brasil (Vargas-Hernández et al. 2012; Lasta et al. 2013; Santos et al. 2013; Tanikawa et al. 2013).

La ausencia de las otras especies de *Ehrlichia*, en perros, concuerda con los resultados de Romero (2008) y se debe, probablemente, a la ausencia de vectores competentes *A. americanum* y *D. variabilis*, en el país (Romero 2008).

El análisis de las pruebas serológicas y moleculares detectó un 29,7% (121/407) de perros con infección pasada (seropositivos y PCR negativos) y un 2,5% (10/407) de perros con infección

persistente (PI) (seropositivos y PCR positivos). Únicamente en un 0,7% (3/407) de los perros se determinó una infección aguda (seronegativos y PCR positivos).

Los hallazgos hemopatológicos determinados para los perros con infección persistente fueron anemia (hematocrito y hemoglobina bajos) y leucopenia (eosinopenia, y linfopenia). Muchos autores reportan a la anemia, hemoglobinemia y trombocitopenia, como los tres hallazgos más importantes en casi todas las investigaciones, y han asociado estos a la presentación de la enfermedad (Waner et al. 1997; Meneses 1995; Castro et al. 2004; Romero 2008; Shipov et al. 2008; Carlos et al. 2011; Tsachev et al 2103).

El perro no tratado o con un tratamiento inadecuado, puede recuperarse clínicamente y entrar en una fase subclínica, donde sólo el conteo plaquetario parece estar anormal (Waner et al. 1997, Harrus et al. 1998a). Perros en esta fase pueden pasar, por meses o años, como clínicamente sanos (Harrus et al. 1998a), pero representan una fuente de infección. Resultados experimentales indican que el bazo puede guardar las bacterias durante la fase subclínica, y es el último órgano en eliminar las bacterias (Faria et al. 2010).

Los hallazgos hemopatológicos determinados para los perros con infección pasada fueron anemia (hematocrito, hemoglobina y CHCM bajos), trombocitopenia, linfopenia y monocitopenia, lo cual concuerda con otros reportes, que hipotetizan que después de una infección aguda, los perros pueden necesitar hasta 505 días postinfección para que los valores hematológicos vuelvan a ser normales (McClure et al. 2010). Es importante recalcar que en muy pocos casos (1,1%; 5/441) los perros fueron tratados contra ehrlichiosis, por lo tanto, pareciera que la mayor cantidad de perros resolvió la infección con *E. canis* sin tratamiento. Lo anterior indica también, que en Costa Rica, la infección de perros con *E. canis* parece ocurrir sobre todo en forma inadvertida para los propietarios, por lo que se recomienda evaluar la necesidad de administrar tratamiento a perros

que presenten un resultado positivo en una prueba serológica y hallazgos hemopatológicos pero sin presentar signos clínicos. Para que la terapia tenga éxito, es recomendable complementar el diagnóstico con pruebas moleculares, con el propósito de determinar la presencia de la bacteria.

Los hallazgos hemopatológicos determinados para los perros con infección aguda fueron trombocitosis y linfopenia. Anteriormente, se había reportado que la causa de la leucopenia era debido a monocitopenia y eosinopenia (Villaescusa et al. 2013; Tsachev et al. 2013), pero no a linfopenia como ocurrió en este estudio.

La edad (∞) se determinó como un factor de riesgo asociado a seropositividad a *E. canis*, lo que concuerda con varios estudios, ya que mientras más edad tenga el perro, mayor es la probabilidad de exposición a vectores infectados (Rodríguez-Vivas 2005; Pinter et al. 2008; Tanikawa et al. 2013; Vieira et al. 2013). También, el alto índice de infestación con garrapatas, en este caso mayor a 3,1, se identificó como un factor de riesgo importante asociado a seropositividad (Yuasa et al. 2012). Finalmente, el índice poblacional canino (∞) se determinó como un factor de riesgo asociado a la presencia de anticuerpos contra *E. canis*. En la literatura no se encontró soporte a este hallazgo, ya que no ha sido un factor estudiado hasta la fecha.

Se encontró asociación solamente con signos muy inespecíficos (actitud depresiva y llenado capilar lento) con seropositividad a *E. canis*, debido, probablemente, a que la mayoría de perros seropositivos (120) habían eliminado ya la bacteria, mientras que solamente diez animales presentaron infección persistente y, probablemente, se encontraban cursando la fase subclínica de la enfermedad, caracterizada por la ausencia de manifestación clínica. La actitud depresiva ha sido descrita en muchos estudios (Foglia-Manzillo et al. 2006) mientras que el llenado capilar lento se relaciona con la anemia (Silverstein y Hopper 2009; Drobotz et al. 2011). Según Procajlo et al. (2011), los perros persistentemente infectados con *E. canis* tienen un curso asintomático, hasta que

circunstancias no favorables ocasionan el desarrollo de la fase crónica con signos inespecíficos que pueden durar hasta cinco años. En contraste, Harrus et al. (1998b) determinaron que después de la fase aguda de la enfermedad, la infección puede persistir, generalmente, después de una recuperación clínica espontánea o de un tratamiento ineficiente, entrando los animales a una fase subclínica, para desarrollar en circunstancias no favorables, la enfermedad crónica.

Ser de raza pura resultó un factor protector contra seropositividad a *E. canis*. Este hallazgo se puede deber a que los perros positivos sin raza definida (55,7%) tuvieron un 14,3% más de infestación con garrapatas que las razas puras y fueron medicados un 9,7% y un 19,2% menos que los perros de raza pura, contra garrapatas y pulgas respectivamente. Esto hace pensar que esta asociación se debe, por consiguiente, más a factores extrínsecos que a factores inmunológicos. Según Nyindo et al. (1980) los pastores alemanes son más susceptibles a adquirir la enfermedad que otras razas, con un curso más severo y tasa de mortalidad mucho más alta, ya que la respuesta inmunológica celular está disminuida. En este estudio no hubo pastores alemanes seropositivos a *E. canis*.

Los factores de riesgo asociados a perros PCR positivos a *E. canis* fueron: actitud depresiva, mucosas membranas muy pálidas, fiebre, signos que se reportan normalmente, asociados a ehrlichiosis (Buhles et al. 1974; Foglia-Manzillo et al. 2006; Dantas-Torres 2008a). El índice poblacional canino mayor a 2,1 con el perro resultó ser un factor de riesgo asociado a sujetos PCR positivos que no había sido estudiado ni reportado hasta la fecha.

Un factor de riesgo que se determinó asociado a perros con garrapatas PCR positivas a *E. canis* fue la sospecha de ehrlichiosis del veterinario, lo que resulta lógico, ya que la presencia de garrapatas y signos clínicos compatibles con ehrlichiosis, inducen a esta sospecha. Este factor de riesgo tampoco había sido investigado en trabajos anteriores. También, que se haya administrado

un tratamiento fundamentado en dicha sospecha, se determinó como factor de riesgo. Esto puede deberse a que el tratamiento pudo haber sido ineficaz, así como que el perro pudo haber sido infestado por una garrapata infectada con la bacteria de la sangre de otro perro o por otro vector. Solamente dos de los nueve perros con garrapatas PCR positivas a *E. canis* fueron también PCR positivos (infección persistente). El retraso en el tiempo de llenado capilar se asocia con anemia (Silverstein y Hopper 2009; Drobatz et al. 2011).

El sexo macho se determinó, en el presente estudio, como factor protector asociado a perros con garrapatas PCR positivas a *E. canis*. Muchos autores señalan lo contrario (Lochmiller y Dabbert 1993; Rolff 2002; Trapp et al. 2006; Costa et al. 2007; Nunn et al. 2009; Restif y Amos 2010). Sin embargo, Lazzaro y Little (2009) proponen que los factores ambientales pueden influenciar la evolución del sistema inmune, siempre y cuando estos factores ejerzan un impacto sobre la variación del genotipo del hospedador, ocasionando así, que algunos genotipos sean más inmunocompetentes en ciertos ambientes y que otros se desenvuelvan mejor en otros ambientes. La razón por la que el sexo macho resultó ser un factor protector a infección con *E. canis* debe de ser estudiada más a fondo en futuros estudios.

4.3. *Rickettsia* spp.

Un problema que se enfrentó al realizar el análisis de factores de riesgo de las muestras seropositivas a rickettsiosis, fue el no poder diferenciar con claridad contra cuál especie de *Rickettsia* estaban dirigidos los anticuerpos en los perros. Se analizó el grupo de perros que presentó anticuerpos contra alguna *Rickettsia* (grupo *Rickettsia* spp.), además se analizaron tres grupos más de perros seropositivos, todos ellos estaban contenidos dentro del grupo de *Rickettsia* spp., un grupo pequeño de perros seropositivos a *R. rickettsii* (grupo *R. rickettsii*), un grupo de

perros seropositivos a *R. amblyommii* (grupo *R. amblyommii*) y un grupo grande de perros seropositivos a *Rickettsias* indefinidas (grupo *Rickettsias* R.i.), esto significa que no se pudo identificar la especie de *Rickettsia* que había infectado al perro, pudiendo ser *R. rickettsii*, *R. amblyommii* o alguna otra *Rickettsia*. El grupo de *Rickettsia* (R.i.) representó la mayoría de las muestras seropositivas, y por consiguiente, no permitió estimar hallazgos hemopatológicos ni asociar factores de riesgo con precisión a una especie de *Rickettsia* específica.

Es, por este motivo, que no se pudo establecer diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis realizados para el grupo de *R. rickettsii*, debido a la poca repetición de muestras positivas (3). Según varios autores, *R. rickettsii* está asociada en perros a anemia, trombocitopenia, leucopenia y leucocitosis acompañada con granulación tóxica de los neutrófilos (Keenan et al. 1977a, b; Breitschwerdt et al. 1985; Breitschwerdt et al. 1988; Comer 1991; Grindem et al. 1999; Gasser et al. 2001). Empero, se analizó qué tan similar eran las medias de los valores entre estos tres grupos, para determinar si el grupo de *Rickettsia* (R.i.) era más cercano a uno de los dos restantes, encontrándose similitudes entre el grupo de *Rickettsia* (R.i.) y el grupo de *R. rickettsii* en los valores de hematocrito, hemoglobina y trombocitos, pero diferencias con el grupo de *R. amblyommii* en los demás valores del hemograma.

Los hallazgos hemopatológicos determinados para los perros con seropositividad a *Rickettsia* spp. fueron leucopenia (linfopenia). En la literatura no se encontraron referencias sobre estos hallazgos, ya que perros seropositivos a *Rickettsia* spp. no habían sido estudiados hasta la fecha. Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden deberse a la presencia de seropositivos a *R. rickettsii* dentro del grupo, que pueden estar influenciando los resultados obtenidos; sin embargo, debe ser aclarado en futuros estudios.

El hallazgo hemopatológico determinado para los perros con seropositividad a *R. amblyommii* fue policitemia (valores de hematocrito y hemoglobina altos). Estos hallazgos no han sido reportados en la literatura hasta la fecha, por lo tanto, no existen referencias bibliográficas. Los valores hematológicos totales del grupo seropositivo a *R. amblyommii* fue similar al grupo de los seronegativos. Este hallazgo se hizo evidente en el análisis del grupo seropositivo a *R. amblyommii* contra *R. rickettsii*, *Rickettsia* (R.i.) y los negativos. Estos datos parecen indicar que *R. amblyommii* no ejerció un efecto patógeno en los perros de este estudio; sin embargo, hasta la fecha, se conoce muy poco sobre la virulencia de *R. amblyommii* en perros. Únicamente en humanos, se ha reportado como patógena y de baja virulencia, provocando una sintomatología leve (Jiang et al. 2010).

Los hallazgos hemopatológicos determinados para los perros con seropositividad a *Rickettsia* (R.i.) fueron anemia (hematocrito y hemoglobina bajos), trombocitopenia y leucopenia (neutropenia -bandas-, eosinopenia y linfopenia). El descenso de los valores anteriores fue descrito por Breitschwerdt et al. (1988) asociado a infección con *R. rickettsii*. Los cambios en los neutrófilos y eosinófilos no habían sido descritos como tales, en la literatura. El cambio en los linfocitos contrasta con la linfocitosis reportada por Breitschwerdt et al. (1988), sin embargo, señalan que puede haber una leucopenia seguida por una leucocitosis. Estos hallazgos determinados en los perros seropositivos a *Rickettsias* indefinidas pueden deberse a la presencia de perros seropositivos a *R. rickettsii* dentro del grupo, como se señaló anteriormente; sin embargo, esto debe ser aclarado en futuros estudios. Es necesario implementar mejores métodos diagnósticos serológicos para poder identificar la especie de *Rickettsia* involucrada en la reacción inmunológica de los perros y así poder asociar los hallazgos hemopatológicos a una especie específica.

En el estudio de factores de riesgo de rickettsiosis se determinaron diferentes factores de riesgo o de protección al grupo de *Rickettsia* spp. o al grupo de *Rickettsia* indefinidas, no así para el grupo de *R. amblyommii* o para *R. rickettsii*. Se hipotetiza que los factores de riesgo asociados a los primeros dos grupos obedezcan, posiblemente, a que dentro de ese grupo se encuentran perros que habían sufrido infecciones con *R. rickettsii*, y que algunos factores pueden estar subestimados por la presencia de perros infectados con *R. amblyommii* dentro de estos grupos, si se determina a esta como no patógena.

Se determinó la edad (∞) como factor de riesgo asociado a seropositividad tanto a *Rickettsia* spp. como a *Rickettsia* (R.i.), lo que concuerda con Pinter et al. (2008), quienes consideran que los animales más viejos tienen mayor probabilidad de adquirir la bacteria, debido a que tienen mayor probabilidad de contagio, por exponerse más tiempo a vectores potencialmente infectados. Otros factores de riesgo que se determinaron en el presente estudio asociados a los grupos de *Rickettsia* spp. y *Rickettsia* (R.i.) fueron: anorexia, la talla de los perros (en una relación directamente proporcional al riesgo en el primer caso y talla mediana en el segundo), la permanencia de los perros fuera de la casa, además del índice de infestación con garrapatas (∞) e índices mayores a 2,1 de infestación con pulgas. Al respecto, Melo et al. (2011) encontraron mayor cantidad de infecciones con *Rickettsia* spp. en perros infestados con *A. cajennense*. La anorexia, otro factor de riesgo asociado a seroprevalencia en el estudio, había sido reportado previamente (Breitschwerdt et al. 1985; Maxie 2007; Piranda et al. 2008; Gyles et al. 2010). Sobre la talla y permanencia de los perros fuera de la casa no se habían reportado, hasta el momento, como factores de riesgo.

Los factores de riesgo que se encontraron asociados, únicamente, con seropositividad al grupo de *Rickettsia* spp. fue el edema escrotal. Este último había sido asociado en un estudio

retrospectivo de Gasser et al. (2001) y reportado por varios autores (Hirsh et al. 2004; Maxie 2007), asociado principalmente a *R. rickettsii*; los otros factores no habían sido estudiados hasta la fecha.

Los factores de riesgo asociados únicamente con seropositividad a *Rickettsia* (R.i.) fueron: membranas mucosas pálidas, sangrados y un diagnóstico previo de ehrlichiosis. El haber sido diagnosticado con ehrlichiosis es congruente con la literatura consultada, ya que se ha demostrado que pueden estar circulando otros patógenos en vectores, y ocasionar coinfecciones en el hospedador (Kordick et al. 1999; Shaw et al. 2001). Sin embargo, es importante considerar a *R. rickettsii* como diagnóstico diferencial de ehrlichiosis, ya que cursa con manifestaciones clínicas similares a *E. canis* (Greene 2012). También, se estableció el sangrado como factor de riesgo, lo cual ya había sido reportado previamente (Breitschwerdt et al. 1985; Grindem et al. 1999), mientras que el haber presentado membranas mucosas pálidas no había sido descrito con anterioridad; sin embargo, concuerda con los procesos de hemorragias y anemia que ocasiona la rickettsiosis.

El sexo macho resultó también ser un factor protectorio contra *Rickettsia* spp. y *Rickettsia* (R.i.). Esto contrasta con Gasser et al. (2001), quienes no encontraron asociación con el sexo; sin embargo, sus estudios solamente se basaron en una población de treinta perros, un 50% de ellos seropositivos. El ser de una raza pura se determinó también como factor protectorio contra seropositividad a *Rickettsia* spp. y *Rickettsia* (R.i.). Esto contrasta con Weiser y Greene (1989) quienes encontraron asociación con razas puras, reportándolas más propensas a desarrollar la enfermedad que las razas mixtas, sobre todo el pastor alemán y el springer spaniel inglés. Las razones de estos hallazgos pueden ser, como ya se discutió con *E. canis*, que en el presente estudio, el porcentaje de infestación con ectoparásitos fue mayor en los animales sin raza definida

que en los perros de raza pura, además, de que el tratamiento que se realiza contra ectoparásitos es menor en los perros de raza mixta que en los de raza pura. Una vez más, parecieran adquirir peso los factores extrínsecos.

Los factores de riesgo asociados a perros con garrapatas PCR positivas a *Rickettsia* spp. fueron la raza pura. La raza mixta se había descrito como factor protectorio contra infecciones ocasionadas por *R. rickettsii* y por consiguiente, la raza pura como factor de riesgo (Greene, 2012).

Un factor protectorio para perros contra garrapatas PCR positivas a *Rickettsia* spp. fue el haber recibido tratamiento contra la infestación de pulgas. Se puede hipotetizar que lo anterior ocurre porque los productos pulguicidas son también, en su gran mayoría, garrapaticidas y, por lo tanto, reducen la posibilidad de adquirir los agentes.

En contraste, los factores de riesgo en el presente estudio asociados a perros con pulgas PCR positivas a *Rickettsia* spp. fueron la alta cantidad de personas que convivían con el perro (∞) y que el perro fuera de raza pura; factores que no se habían asociado en investigaciones hasta la fecha. Solamente, la raza mixta se había descrito como factor protectorio contra infecciones ocasionadas por *R. rickettsii* y por consiguiente, la raza pura como factor de riesgo (Greene, 2012). Es necesario realizar investigaciones para determinar las causas de esta relación (a mayor cantidad de personas conviviendo con el perro, mayor riesgo de pulgas seropositivas), ya que las rickettsias pueden infectar también a los humanos.

Se determinó además, como factores protectorios de perros con pulgas PCR positivas a *Rickettsia* spp. el sexo macho y el permanecer fuera del hogar además del estatus de deambulaci3n. El sexo de los machos ya había sido determinado como un factor protectorio en un estudio donde se estableci3 un porcentaje de seropositividad del 66,7% de *R. felis* en las hembras más que en los machos (Hii et al. 2013). Hasta la fecha, no se había reportado como factores de

riesgo, el que los perros permanezcan fuera del hogar o en deambulaci3n y es necesaria mayor investigaci3n al respecto.

4.4. Seropositividad mixta

En el presente estudio se analiz3 por primera vez el efecto sobre los valores hematol3gicos de perros que sufrieron contanto con *E. canis* y *Rickettsia* spp. Estas infecciones mixtas ocurren, con frecuencia, en los animales (Rutter, 1982) y los efectos sin3rgicos entre los dos agentes puede que no sean visibles, porque las manifestaciones cl3nicas de las infecciones ocasionadas por *E. canis* y *Rickettsia* spp. son muy similares. Al analizar las muestras de perros de esta manera, se pudo determinar una cambio mayor de los valores del hemograma (hematocrito, hemoglobina, trombocitos, leucocitos, neutr3filos segmentados y linfocitos), con respecto a los valores determinados en muestras de perros que fueron solamente positivas a un agente.

En el an3lisis de los perros con seropositividad mixta (*E. canis* y *Rickettsia* spp.) se determin3 diferencias en el valor de leucocitos y monocitos, comparado con perros seropositivos a *E. canis*, siendo menores los valores en perros con seropositividad mixta. Adem3s, se determinaron diferencias en los valores de hematocrito, hemoglobina y neutr3filos segmentados en perros con seropositividad mixta en comparaci3n con perros seropositivos a *Rickettsia* spp.. De nuevo, los valores en perros con seropositividad mixta fueron menores que en seropositividad simple.

Al analizar los valores de perros con seropositividad mixta de *E. canis* y *Rickettsia* indefinidas (R.i.) se determinaron diferencias en el valor de leucocitos, neutr3filos segmentados y monocitos, siendo estos valores menores en la seropositividad mixta que en perros seropositivos 3nicamente a *E. canis*. Adem3s, se determin3 diferencias en los valores de hemoglobina,

neutrófilos segmentados y neutrófilos en banda, en los perros con seropositividad mixta en comparación con los valores de perros con seropositividad a *Rickettsia* (R.i.). De nuevo, los valores en la seropositividad mixta fueron menores.

Finalmente, los valores de perros con seropositividad mixta a *E. canis* y *R. amblyommii* no mostraron diferencias con respecto a los valores de los animales negativos; sin embargo, el número de positivos fue muy pequeño, como para sugerir que esto ocurra siempre en coinfecciones de *E. canis* y *R. amblyommii*.

4.5. Sobre la metodología de investigación

El muestreo en parques recreativos demostró ser una herramienta importante para realizar investigaciones sobre agentes infecciosos transmitidos por vectores. Por su carácter aleatorio, recoge individuos de diversas zonas geográficas y los resultados son extrapolables a otros grupos de perros, de zonas urbanas y suburbanas, que no acostumbran visitar parques recreativos. Por lo tanto, estos perros sirven como centinelas.

La población de humanos en riesgo directamente asociada con la población muestreada fue de 1424 personas, y la población canina en riesgo fue de 513 perros que cohabitaban con los sujetos estudiados.

El análisis de los datos, tomando en cuenta los resultados de las diferentes pruebas diagnósticas, permite la depuración de los hallazgos patológicos, dado que los efectos se pueden sobreestimar o subestimar en los promedios del cuadro hematológico, puesto que las respuestas inmunológicas pueden ser favorables o no, a diferentes agentes infecciosos en coinfección.

La carga de uno o ambos agentes infecciosos, puede estar aumentada o puede estar disminuida en una o en ambas (Cox, 2001), ejerciendo acción sinérgica o suprimiendo la acción patológica sobre la otra.

Estas infecciones múltiples ocurren frecuentemente en las poblaciones de animales de países en desarrollo, siendo más comunes que las infecciones simples (Petney y Andrews, 1998).

5. CONCLUSIONES

- Se identificó las especies de ectoparásitos, el sexo y el estadio de los ectoparásitos. De las garrapatas, se identificaron 608 *R. sanguineus* (280 hembras, 250 machos, 64 ninfas y 14 larvas), ocho *A. ovale* (4 hembras y 4 machos), tres *I. boliviensis* (1 hembra y 2 ninfas), dos *A. cajennense* (2 machos) y una *A. maculatum* (1 macho). De las pulgas, se identificaron 509 *C. felis* (364 hembras y 145 machos), treinta y un *P. simulans* (23 hembras y 8 machos), dos *Pulex* spp. (2 hembras) y una *E. gallinacea* (1 hembra). Por último, de los piojos se identificaron cinco piojos (4 *H. spiniger* y 1 *T. canis*).

- Se determinó una seroprevalencia de *E. canis* del 32,1%.
- Se determinó un porcentaje de infección de *E. canis* en perros del 3,2%.
- Se determinó un porcentaje de infección de *E. canis* en garrapatas de perros del 6,9% de las garrapatas analizadas (*R. sanguineus* en todos los casos).

- Mediante secuenciación molecular, se determinó *E. canis* como la especie de *Ehrlichia* circulante, tanto en la sangre de los perros positivos como de las garrapatas positivas.

- Los hallazgos hemopatológicos relacionados a la infección persistente con *E. canis* fueron anemia (hematocrito y hemoglobina bajos) y leucocitopenia (eosinopenia, y linfopenia); aquellos relacionados a la infección aguda con *E. canis* fueron trombocitosis y linfopenia y los relacionados a la infección pasada con *E. canis* fueron anemia (hematocrito, hemoglobina y CHCM bajos), trombocitopenia, monocitopenia, y linfopenia.

- Los hallazgos hemopatológicos relacionados a seropositividad a *Rickettsia* spp. fueron leucocitopenia (eosinopenia y linfopenia), aquellos relacionados a seropositividad a *Rickettsia* (R.i.) fueron anemia (hematocrito y hemoglobina bajos), trombocitopenia y leucopenia

(eosinopenia y linfopenia), y relacionado a seropositividad a *R. amblyommii* fue la policitemia (hematocrito y hemoglobina aumentados). No se pudo establecer ningún hallazgo relacionado a seropositividad a *R. rickettsii*.

- Los hallazgos hemopatológicos relacionados a seropositividad tanto a *E. canis* como a *Rickettsia* spp. fueron leucopenia (monocitopenia) comparado con seropositividad simple a *E. canis* y anemia (hematocrito y hemoglobina bajos) y neutropenia (segmentados) en comparación a seropositividad simple a *Rickettsia* spp. El relacionado a seropositividad tanto a *E. canis* como a *Rickettsia* (R.i.) fue leucopenia (neutropenia -segmentados- y monocitopenia) comparado con seropositividad simple a *E. canis*; y anemia (hemoglobina baja) y neutropenia (segmentados y bandas) en comparación con seropositividad simple con *Rickettsia* (R.i.).

- Como factores de riesgo asociados a seropositividad a *E. canis* se determinaron la edad (∞), actitud depresiva, llenado capilar lento, índice poblacional canino (∞), índices mayores a 3,1 de infestación con garrapatas; mientras que la raza pura se determinó como un factor protector. Los factores de riesgo asociados a perros PCR positivos fueron: actitud depresiva, membranas mucosas muy pálidas, fiebre, índice poblacional canino (1-2) e índices mayores a 2,1 de infestación con garrapatas, y los factores de riesgo asociados a perros con garrapatas PCR positivas fueron: llenado capilar lento, sospecha del veterinario de ehrlichiosis y administración de un tratamiento fundamentado en dicha sospecha.

- Como factores de riesgo asociados con seropositividad a *Rickettsia* spp. se determinaron los siguientes: edad (∞), edema escrotal, anorexia, talla (∞), permanencia fuera del hogar, índice de infestación con garrapatas (∞) e índices mayores a 2,1 de infestación con pulgas; mientras que el sexo macho y la raza pura se establecieron como factores protectivos; factores de riesgo asociados a seropositividad a *Rickettsia* (R.i): edad (∞), membranas mucosas pálidas, anorexia,

sangrados, talla mediana, permanencia fuera del hogar, presencia de más de cuatro personas conviviendo con el perro, diagnóstico de ehrlichiosis y altos índices de infestación con garrapatas (∞), e índices mayores a 2,1 de infestación con pulgas; mientras que el sexo macho y la raza pura se establecieron como factores protectivos. Como factor de riesgo asociado a perros con garrapatas PCR positivas a *Rickettisa* spp. se identificó la raza pura y como factor protectorio el haber sido tratado contra infestación de pulgas. Finalmente, los factores de riesgo asociados a perros con pulgas PCR positivas a *Rickettisa* spp. fueron: la raza pura y cantidad de personas conviviendo con el perro (∞), y factores protectivos: el sexo macho y la permanencia fuera del hogar y el estatus de deambulaci3n de los perros.

6. RECOMENDACIONES

- Divulgar los datos de seroprevalencia y prevalencia que se determinaron en este estudio a la comunidad médica nacional, a las municipalidades de los parques participantes en este estudio y a la población en general.

- Informar a la comunidad médica nacional sobre los factores de riesgo asociados a perros seropositivos, perros PCR positivos, y ectoparásitos PCR positivos de perros, para que se incorporen estos factores dentro de la anamnesis.

- Utilizar la PCR cuando se sospeche de ehrlichiosis y se desee aplicar el tratamiento con doxiciclina, ya que solamente 10 (7,6%) de los 131 perros seropositivos a *E. canis* tenían efectivamente la bacteria en la sangre (infección activa).

- Tratar solamente a aquellos pacientes que presenten clínica evidente y hallazgos hemopatológicos, mientras se realiza la PCR respectiva, ya que la gran mayoría de perros seropositivos (92,6%) no tenían la bacteria en la sangre, pero mostraron diferencias significativas en los valores de hematocrito, hemoglobina, CHCM, conteo plaquetario, linfocitos y monocitos, con respecto a perros seronegativos.

- Tomar en cuenta a *R. rickettsii* dentro de los diagnósticos diferenciales en perros, cuando se presente una sintomatología compatible con ehrlichiosis. Aunque no se pudo observar alteraciones en los valores hematológicos, ni asociar factores de riesgo a *R. rickettsii*, sí hubo muestras seropositivas a esta bacteria patógena que podría estar asociada a los cuadros “difíciles”, que no tienen resolución con el tratamiento regular contra ehrlichiosis.

- Implementar técnicas serológicas que puedan diferenciar, con certeza, los anticuerpos contra las diferentes especies de *Rickettsia* en humanos y animales domésticos y silvestres.

- Investigar del papel que juegan las infecciones con *R. amblyommii* en los perros, ya que los valores hematológicos de este grupo de perros seropositivos a este agente no mostraron alteraciones con respecto al grupo de perros seronegativos, por lo que *R. amblyommii* podría ser un agente apatógeno para perros y ejercer en éstos algún tipo de inmunidad protectora frente a otras especies de rickettsias.

- Informar a los propietarios de las mascotas sobre los factores de riesgo, para que puedan tomar las medidas necesarias para controlar y así reducir la exposición de sus animales a los agentes.

- Informar a las comunidades sobre la importancia del control de ectoparásitos para evitar la transmisión de las bacterias y enseñar las mejores maneras de lograr el control de ectoparásitos.

7. LISTA DE REFERENCIAS

- Ábrego L. 2008. Detección de Anaplasmataceae en garrapatas colectadas de perros y *Anaplasma platys* en muestras de sangre de perros de Costa Rica mediante la técnica de PCR. Tesis de Maestría. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Acha P. 1979. Manual para médicos veterinarios de la campaña nacional contra la garrapata. CNPA, México.
- Acosta R, Morrone JJ. 2003. Clave ilustrada para la identificación de los taxones supraespecíficos de siphonaptera de México. Acta Zoológica Mexicana 89: 39-53.
- Ahantari A, Trinachartvanit W, Milne JR. 2008. Tick-borne pathogens and diseases of animals and humans in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 39 (6): 1015-32.
- Álvarez V. Taxonomía de garrapatas. 2003. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección de Salud Animal. Costa Rica.
- Álvarez V, Bonilla R, Cascante J. 2006. Casuística de *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) en perros atendidos en clínicas veterinarias ubicadas en los cantones de Escazú, Santa Ana y Mora. Cienc. Vet. 24: 9-18.
- Álvarez V, Hernández V, Gamboa J. 2005. Catálogo de garrapatas suaves (Acari: Argasidae) y duras (Acari: Ixodidae) de Costa Rica. Brenesia. 63-64: 81-88.
- Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 29:2838-2842.
- Anderson BE, Greene CE, Jones DC, Dawson JE. 1992. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int J Syst Bacteriol. 42(2):299-302.

- Anziani OS, Ewing SA, Barker RW. 1990. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. Am. J. Vet. Res. 51: 929-931.
- Barnwell RE, Ohashi N, Rikihisa Y. 1999. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the human granulocytic ehrlichiosis agent, colocalize with transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. Infect. Immun. 67: 2258-2265.
- Barker EN, Langton DA, Helps CR, Brown G, Malik R, Shaw SE, Tasker S. 2012. Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote aboriginal communities in Australia. BMC Vet. Res. 8:55.
- Barriga O. 1997. Veterinary parasitology for practitioners. 2 ed. Burgess Publishing. Minnesota.
- Beaufils JP, Martin-Granel J, Jumelle P. 1995. Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp. 30: 89-195.
- Beall MJ, Alleman AR, Breitschwerdt EB, Cohn LA, Couto CG, Dryden MW, Guptill LC, Iazbik C, Kania SA, Lathan P, Little SE, Roy A, Saylor KA, Stillman BA, Welles EG, Wolfson W, Yabsley MJ. 2012. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. Parasit. Vectors. 5:29.
- Bermúdez S, Miranda R. 2011. Distribución de los ectoparásitos de *Canis lupus familiaris* (Carnivora: Canidae) de Panamá. Rev. MVZ Córdoba 16: 2274-2282.
- Bermúdez CS, Zaldívar AY, Spolidorio MG, Moraes-Filho J, Miranda RJ, Caballero CM, Mendoza Y, Labruna MB. 2011. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. Vet. Parasitol. 177: 134-138.
- Binquet C, Verret C, Chêne G, Salmi LR, Letenneur L, Palmer G, Hajjar M, Salamon R. 1998. Major statistical software usable in epidemiology. Rev. Epidemiol. Sante Publique. 46: 329-36.

- Bowman DD. 2009, Georgi's Parasitology for veterinarians. 9 ed. Missouri: Saunders.
- Breitschwerdt EB, Abrams-Ogg AC, Lappin MR, Bienzle D, Hancock SI, Cowan SM, Clooten JK, Hegarty BC, Hawkins EC. 2002. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *J Vet Intern Med* 16:642-649.
- Breitschwerdt EB, Meuten DJ, Walker DH, Levy M, Kennedy K, King M, Curtis B. 1985. Canine Rocky Mountain spotted fever: a kennel epizootic. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2124-8.
- Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2645-2651.
- Breitschwerdt EB, Walker DH, Levy MG, Burgdofer W, Cobertt WT, Hurlbert SA, Stebbins ME, Curtins BC, Allen DA. 1988. Clinical, hematologic and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. *Am. J. Vet. Res.* 49: 70-76.
- Bremer WG, Schaefer JJ, Wagner ER, Ewing SA, Rikihisa Y, Needham GR, Jittapalapong S, Moore DL, Stich RW. 2005. Transtadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 131: 95-105.
- Brenes D, Brenes S, Quirós I. 2011. Ehrlichiosis: reporte de 2 casos. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica.* 598: 315-318.
- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric-Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 1108-32.
- Buhles WC Jr, Huxsoll DL, Hindlebrant PK. 1974. Tropical canine pancytopenia; role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease. *J. Comp. Pathol.* 130: 511-521.

- Burgdorfer, W. 1970. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 1010-1014.
- Campbell CC, Hobbs JH, Marranghello L, Vargas M, Shepard C, Feldman RA. 1974. An apparent outbreak of rickettsial illness in Costa Rica. *Bull. Pan. Am. Health. Organ.* 12: 104-11.
- Castro MB, Machado RZ, Aquino LPT, Alessi AC, Costa MT. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119: 73-86.
- Carlos RS, Carvalho FS, Wenceslau AA, Almosny NR, Albuquerque GR. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2011 20: 210-4.
- Comer KM. 1991. Rocky Mountain spotted fever. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21: 27-48.
- Costa LM, Rembeck K, Ribeiro MF, Beelitz P, Pfister K, Passos LM. 2007. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *Vet. J.* 174: 673–676.
- Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB. 2008. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat.* 3 ed. Elsevier, Missouri.
- Cox FE. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology.* 122 Suppl: S23-38.
- Dantas-Torres F. 2007. Rocky Mountain Spotted Fever. *Lancet. Infect. Dis.* 7: 724-32.
- Dantas-Torres F. 2008a. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit. Vectors.* 1:25.
- Dantas-Torres F. 2008b. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152: 173-185.

- Da Silva Costa LF, Nunes PH, Soares JF, Labruna MB, Camargo-Mathias MI. 2011. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). *Parasit. Vectors* 4: 222.
- Dawson JE, Biggie KL, Warner CK, Cookson K, Jenkins S, Levine JF, Olson JG. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1175-1179.
- Dawson JE, Ewing SA. 1992. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1322-1327.
- Demma LJ, Traeger M, Blau D, Gordon R, Johnson B, Dickson J, Ethelbah R, Piontkowski S, Levy C, Nicholson WL, Duncan C, Heath K, Cheek J, Swerdlow DL, McQuiston JH. 2006. Serologic evidence for exposure to *Rickettsia rickettsii* in Eastern Arizona and recent emergence of Rocky Mountain Spotted Fever in this region. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6: 423-429.
- Drobatz KJ, Beal MW, Syring RS. 2011. *Manual of trauma management in the dog and the cat*. 1 ed. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2145-2165
- Durden LA, Musser GG. 1994. The sucking lice (Insecta: Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographic distributions. *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 218: 1-90.

- Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. 2013. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 169-73
- Emerson KC, Price RD. 1975. Mallophaga of Venezuelan mammals. *Biological Series.* 20: 1-77.
- Escobar LE, Álvarez D, Villatoro FJ, Morán D, Estévez A. 2011. Two new records from Guatemala: *Pulex simulans* and *Echidnophaga gallinacea* (Siphonaptera: Pulicidae), and their host-parasite relationship. *Journal of Parasitology and Vector Biology.* 3: 40-43.
- Ewing SA, Dawson JE, Kocan AA, Barker RW, Warner CK, Panciera RJ, Fox JC, Kocan KM, Blouin EF. 1995. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32: 368-374.
- Ewing SA, Roberson WR, Buckner RG, Hayat CS. 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. *J. AM. Vet. Med. Assoc.* 159: 1771-1774.
- Fairchild G, Kohls G, Tripton V. 1996. The ticks of Panama (Acarina: Ixodidae). In: Wanzel and Tripton. *Ectoparasites of Panama.* Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois.
- Faria JL, Dagnone AS, Munhoz TD, João CF, Pereira WA, Machado RZ, Tinucci-Costa M. 2010. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.* 19: 98-102.
- Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (eds). 2000. *Schalm's Veterinary Hematology.* 5th ed. Filadelfia.
- Foglia-Manzillo V, Cappiello S, Oliva G. 2006. Tick-transmitted diseases in dogs: clinicopathological findings. *Parasitologia.* 48: 135-6.
- Fornaguera I. 2013 Oct 9. Mayoría de casas se concentra en 15% del territorio nacional. *La Nación*; Secc 4A.

- Fournier PE, Raoult D. 2009. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. Ann. NY. Acad. Sci. 1166: 1–11.
- Fuentes LG. 1979. Primer caso de fiebre de las Montañas Rocosas en Costa Rica, América Central. Rev. Latinoam. Microbiol. 21: 167–172.
- Fuentes L, Calderón A, Hun L. 1985. Isolation and identification of *Rickettsia rickettsii* from the rabbit tick *Haemophysalis leporispalustris* in the Atlantic zone of Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 564-567.
- Fuentes LG. 1986. Ecological study of rocky mountain spotted fever in Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 192-196.
- [FUPROVI] Fundación Promotora de Vivienda. 2012. Situación de vivienda y desarrollo urbano en Costa Rica 2011. Costa Rica.
- Gasser AM, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB. 2001. Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 37: 41-8.
- Georgi JR, Georgi ME. 1994. Parasitología en clínica canina. McGraw-Hill. Atlapampa, México.
- Gómez-Lucía E, Blanco MM, Dómenech A. 2007. Manual de inmunología veterinaria. Pearson educación, S.A. Madrid. Pp. 431- 447.
- Goodman RA, Hawkins EC, Olby NJ, Grindem CB, Hegarty B, Breitschwerdt EB. 2003. Molecular identification of *Ehrlichia ewingii* infection in dogs: 15 cases (1997-2001). J. Am. Vet. Med. Assoc. 222: 1102-1107.
- Greene CE. 2012. Infectious diseases of the dog and the cat. 4 ed. Elsevier, Missouri. Pp. 227-270.
- Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. 1996. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J. Clin. Microbiol. 34: 44-8.

- Grindem CB, Breitschwerdt EB, Perkins PC. 1999. Platelet-associated immunoglobulin (anti-platelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 35: 56-61.
- Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36: 937-940.
- Guedes E, Leite R, Prata M, Pacheco R, Walker D, Labruna M. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 841-845.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2010. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4 ed. Blackwell, Iowa.
- Harrus S, Aroch I, Lavy E, Bark H. 1997. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet. Rec.* 141: 247-50.
- Harrus S, Waner T, Weiss DJ, Keysary A, Bark H. 1996a. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51: 13-20.
- Harrus S, Waner T, Eldor A, Zwang E, Bark H. 1996b. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Rec.* 139: 290-293
- Harrus S, Warner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. 1998a. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 73-76.
- Harrus S, Waner T, Keysary A, Aroch I, Voet H, Bark H. 1998b. Investigation of splenic function in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62: 15-2
- Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AW. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2745-2749

- Harrus s, Alleman AR, Bark H, Mahan SM, Waner T. 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. Vet. Microbiol. 86: 361-368.
- Hernández J. 1997. Recopilación de informes de hallazgos parasitológicos en el territorio nacional de los años: 1982 a 1996. Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria. Heredia, Costa Rica.
- Hernández-de Mezerville V, Padilla-Cuadra J. 2007. Choque séptico por ehrlichiosis. Acta méd. costarric. 49: 118-120.
- Heymann W. 1996. Rickettsial Microbiology. Clin. Dermatol. 14: 243-44.
- Hii SF, Abdad MY, Kopp SR, Stenos J, Rees RL, Traub RJ. 2013. Seroprevalence and risk factors for *Rickettsia felis* exposure in dogs from Southeast Queensland and the Northern Territory, Australia. Parasit. Vectors 6: 159.
- Higgins JA, Azad AF. 1995. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: A review. J. Med. Entomol. 32: 1010-1014.
- Hirsh DC, McLachlan NJ, Walker RL. 2004. Veterinary microbiology. 2 ed. Blackwell, Iowa.
- Hun L. 2013. Rickettsiosis en Costa Rica. Acta méd. costarric. 1: 25-28.
- Hun L, Troyo A, Taylor L, Barbieri AM, Labruna MB. 2011. First report of the isolation and molecular characterization of *Rickettsia amblyommii* and *Rickettsia felis* in Central America. Vector Borne Zoonotic Dis. 11: 1395-1397.
- Hun L, Cortes X, Taylor L. 2008. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79: 899-902.
- Hun L, Herrero L, Fuentes L, Vargas M. 1991. Tres nuevos casos de fiebres manchadas de las montañas rocosas en Costa Rica. Rev. Cost. Cienc. Med. 12: 51-56.

- Ijdo JW, Wu C, Magnarelli LA, Stafford KC, Anderson JF, Fikrig E. 2000. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* DNA in *Amblyomma americanum* ticks in Connecticut and Rhode Island. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4655-4656.
- [INEC] Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2012. X Censo Nacional de Población y IV de Vivienda Costa Rica: Resultados Generales. San José, Costa Rica: GEDI/ICE.
- [IOM] Institute of Medicine. 2003. Microbial threats to health: emergence, detection, and response. National Academies Press. Washington, DC.
- [IOM] Institute of Medicine. 2008a. Global climate change and extreme weather events: understanding the contributions to infectious disease emergence. National Academies Press. Washington, DC.
- [IOM] Institute of Medicine. 2008b. Vector-borne diseases: understanding the environment, human health, and ecological connections. National Academies Press. Washington, DC.
- [IOM] Institute of Medicine. 2011. The causes and impacts of neglected tropical and zoonotic diseases: opportunities for integrated intervention strategies: workshop summary. Forum on microbial threats. National Academies Press. Washington, DC.
- Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. 1994. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1658-1662.
- Jackson ML. 2007. Veterinary clinical pathology. Blackwell, Iowa. Pp. 3-80, 109-136.
- Jiang J, Yarina T, Miller MK, Stromdahl EY, Richards AL. 2010. Molecular detection of *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma americanum* parasitizing humans. *Vector-borne and zoonotic diseases.* 4: 329-340

- Johnson EM, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Crow DW, Kocan M. 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acar: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 74: 277-288.
- Jones E, Clifford C, Keirans J, Kohls G. 1972. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Brigham Young University Science Bulletin.* 17: 11-33.
- Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. 2006. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl. Environ Microbiol.* 72: 1102-9.
- Keefe T, Holland CJ, Salyer PE, Ristic M. 1982. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *J. Am. Vet. Assoc.* 181: 236-238.
- Keenan KP, Buhles WC, Huxsoll Jr DL, Williams RG, Hildebrandt PK .1977a. Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. *Am. J. Vet. Res.* 38: 851-856.
- Keenan KP, Buhles WC, Huxsoll Jr DL, Williams RG, Hildebrandt PK, Campbell JM, Stephenson EH. 1977b. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever. *J. Infect. Dis.* 135: 911-917.
- Keysary A, Waner T, Rosner M, Warner CK, Dawson JE, Zass R, Bigie KL, Harrus S. 1996. The first isolation, in vitro propagation and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet. Parasitol.* 62: 331-340.
- Kidd L, Breitschwerdt EB. 2003. Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 25: 742-750.

- Kocan A, Crowder Levesque G, Withworth LC, Murphy GL, Ewing SA, Barker, RW. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 477-480.
- Kordick SK, Breitschwerdt E, Hegarty B, Southwick K, Colitz CM, Hancock S, Maccormack J. 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2931–2638.
- Kostman JR. 1996. Laboratory diagnoses of rickettsial diseases. *Clin. Dermatol.* 14: 301-6.
- Melo AL, Martins TF, Horta MC, Moraes-Filho J, Pacheco RC, Labruna MB, Aguiar DM. 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2: 213-8.
- Labruna MB, Pereira MC. 2001. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária.* 30: 24- 32.
- Labruna MB, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal J, Dolz G, Abarca K, Romero L, de Sousa R, Oteo JA, Zavala-Castro J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. MVZ Córdoba* 16: 2435-2457.
- Lasta CS, Santos AP, Messick JB, Oliveira ST, Biondo AW, Vieira RF, Dalmolin ML, González FH. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22: 360-6.
- Lazzaro BP, Little TJ. 2009. Immunity in a variable world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364: 15-26.
- Lee M, Yu D, Yoon J, Li Y, Lee J, Park J. 2009. Natural co-infection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis* in a deer in South Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 101-3.
- Lestoquard F, Donatien A. 1936. Sur une nouvelle *Rickettsia* du mouton. *Bull. Soc. Path. Exot.* 29: 105-108.
- List M. 2009. Situación de las poblaciones caninas en Costa Rica: Presentación del programa nacional de fauna urbana. Servicio Nacional de Salud Animal. Presentación audiovisual. Diciembre del 2009. Costa Rica.

- Lochmiller RL, Dabbert CB. 1993. Immunocompetence, environmental stress, and the regulation of animal populations. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*. 1: 823-855.
- Mason RJ, Lee JM, Curran JM, Moss A, Van Der Heide B, Daniels PW. 2001. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia. *Aust. Vet. J.* 79: 559-62.
- Mavromatis K, Doyle CK, Lykidis A, Ivanova N, Francino MP, Chain P, Shin M, Malfatti S, Larimer F, Copeland A, Detter JC, Land M, Richardson PM, Yu XJ, Walker DH, McBride JW, Kyrpides NC. 2006. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *J. Bacteriol.* 188: 4015-4023.
- Maxie MG. 2007. Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. Vol. 1. 5 ed. Elsevier, Philadelphia.
- McClure JC, Crothers ML, Schaefer JJ, Stanley PD, Needham GR, Ewing SA, Stich RW. 2010. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 12: 5012-20.
- McDade JE, Newhouse VF. 1986. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 287-309.
- Melo ALT, Martins TF, Horta MC, Moraes-Filho J, Pacheco RC, Labruna MB. 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2: 213-218.
- Murphy GL, Ewing SA, Withworth LC, Fox JC, Kocan AA. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79: 325-339.
- Meneses A. 1995. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *Vet. Rec.* 137: 46-47.

- Milstone A, Dumler JS. 2009. Rocky Mountain Spotted Fever. En A.S. Evans, P.S. Brachman (eds.) Bacterial Infections of Humans. Maryland: Springer Science Business Media.
- Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopolous O, Rallis T, Fytianou A. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet. Microbiol. 91: 197-204.
- Mullen G, Durden L. 2002. Medical and veterinary entomology. 1 ed. Elsevier Science. California.
- Munderloh UG, Yabsley MJ, Murphy SM, Luttrell MP, Howerth EW. 2007. Isolation and establishment of the raccoon *Ehrlichia*-like agent in tick cell culture vector borne & zoonotic diseases 7: 418-425.
- Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopolous O, Rallis T, Fytianou A. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet. Microbiol. 91: 197-204.
- Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Walker DH, McBride JW. 2010. Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon. Exp. Appl. Acarol. 50: 163-8.
- Nelson RW, Couto CG. 2009. Small animal internal medicine. 4 ed. Elsevier, Missouri.
- Nicholson W, Allen K, McQuiston J, Breitschwerdt E, Little S. 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends Parasitol. 26: 205-12.
- Nuñez J, Silva R, Ruiz-Castañeda M. 1952. Rickettsiosis en Costa Rica. Rev. Méd. Cos. XI 216: 30-44.

- Nunn CL, Lindenfors P, Pursall ER, Rolff J. 2009. On sexual dimorphism in immune function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364: 61-9.
- Nyindo MBA, Huxsoll DL, Ristic M, Kakoma I, Brown JL, Carson CA, Stephenson EH. 1980. Cell-mediated and humor immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 42: 250-254.
- Onofrio V, Labruna M, Pinter A, Giacomini F, Barros-Battesti D. Comentários e chaves as espécies do gênero *Amblyomma*. 2006. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical Brasil: Instituto Butantan, São Paulo.
- Pachecho K. 2013. Detección de anticuerpos contra *Rickettsia* del Grupo de las Fiebres Manchadas en perros (*Canis lupus*) de parques metropolitanos y sitios recreativos y de ADN de la bacteria en los ectoparásitos vectores. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Paddock C. 2009. The science and fiction of emerging rickettsioses. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1166: 133-143.
- Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32: 897-928.
- Parola P, Davoust B, Raoult D. 2005. Review article: Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.* 36: 469-492.
- Peacock MG, Ormsbee RA, Johnson KM. 1971. Rickettsiosis of Central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 6: 941-949.
- Pérez-Osorio C, Zavala-Velásquez J, Arias-León JJ, Zavala-Castro J. 2008. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg. Infect. Diseases.* 14: 1019-1023.
- Petney TN, Andrews RH. 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* 3: 377-393.

- Piesman J, Eisen L. 2008. Prevention of Tick-Borne Diseases. *Ann. Rev. Entomol.* 53: 17.1-17.21.
- Pinter, A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB. 2008. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of Sao Paulo, Brazil. *Cad. Saude Publica* 24: 247-52.
- Piranda EM1, Faccini JL, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, Labruna MB. 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103: 696-701.
- Procajło A, Skupień EM, Bladowski M, Lew S. 2011. Monocytic ehrlichiosis in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 14: 515-20.
- Reardon MJ, Pierce KR. 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis: Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet. Pathol.* 18: 48-61.
- Restif O, Amos W. 2010. The evolution of sex-specific immune defences. *Proc. Biol. Sci.* 277 1691: 2247-55.
- Rikihisa Y, Swing SA, Fox JC, Siregar AG, Pasaribu FH, Malole MB. 1992. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J. Clin. Microbiol.* 30: 143-148.
- Rímolo M. 2006. Prevalencia serológica y citológica de la ehrlichiosis canina en Costa Rica. Tesis de Grado. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Ristic M, Holland CJ. 1993. Canine ehrlichiosis. In Woldehiwet Z, Ristic M (eds): *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. Pergamon Press, Oxford.
- Robertson RG, Wisseman CL. 1973. Tick-borne Rickettsiae of spotted fever group in West Pakistan and Thailand: evidence for two new species. *Am. J. Epidemiol.* 97: 55-64.
- Rodriguez-Vivas RI, Albornoz RE, Bolio GM. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.* 127: 75-9.

- Rolff J. 2002. Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 269: 867-872.
- Rojas A, Rojas D, Montenegro V, Gutiérrez R, Yasur-Landau D, Baneth G. 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.* 199: 121-8.
- Romero LE. 2008. Caracterización molecular de especies de *Ehrlichia* en perros de Costa Rica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Romero JJ, Breda SV, Vargas B, Dolz G, Frankena K. 2005. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology*. 64: 1928-39.
- Rutter JM. 1982. Diseases caused by mixed agents and factors. In: *The Control of Infectious Diseases in Farm Animals*. British Veterinary Association Trust Project on the future of animal health control, London. Pp 5-10.
- Santos LG, Melo AL, Moraes-Filho J, Witter R, Labruna MB, Aguiar DM. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22: 114-118.
- Sequeira GJ, Dalla-Fontana ML, Zbrun MV, Soto Lorena P, Frizzo LS, Zarazaga MP, Sanchez IC, Signorini ML. 2013. Epidemiological study of recorded trichinosis cases in Santa Fe Province, Argentina, 1998–2009. *Rev. Panam. Salud Pública* 33: 363-369.
- Scorza AV, Duncan C, Miles L, Lappin MR. 2011. Prevalence of selected zoonotic and vector-borne agents in dogs and cats in Costa Rica. *Vet. Parasitol.* 183: 178-83.
- Shaw S, Day M, Birtles R, Breitschwerdt E. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* 17: 74-80.

- Shaw S, Day MJ. 2005. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. 1 ed. London: Manson publishing.
- Shipov A, Klement E, Reuveni-Tager L, Waner T, Harrus S. 2008. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* 153: 131-138.
- Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF. 2007. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet. Microbiol.* 125: 304-312.
- Silber J. 1996. Rocky Mountain Spotted Fever. *Clin. Dermatol.* 14: 245-58.
- Silverstein D, Hopper K. 2009. Small animal critical care medicine. 1 ed. Elsevier, Missouri.
- Solano J, Villalobos J. 2007. Ehrlichiosis granulocitotrópica humana. *Acta méd. costarric.* 49: 121-123.
- Soto JL. 2010. Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum* en garrapatas y venados cola blanca de Costa Rica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.
- Souza BM, Leal DC, Barboza DC, Uzêda RS, De Alcântara AC, Ferreira F, Labruna MB. 2010. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19: 89-93.
- Shipov A, Klement E, Reuveni-Tager L, Waner T, Harrus S. 2008. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* 153: 131-8.
- Spolidorio MG, Minervino AH, Valadas SY, Soares HS, Neves KA, Labruna MB, Ribeiro MF, Gennari SM. 2013. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22: 214-9.

- Standandaert SM, Yu T, Scot MA, Childs JE, Paddock CD, Nicholson WL, Singleton J, Blasser MJ. 2000. Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J. Infect. Dis.* 181: 1082-1088.
- Stockman SL, Scott MA. 2008. Platelets. In: *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2 ed. Ames: Blackwell. 223-257.
- Tanikawa A, Labruna MB, Costa A, Aguiar DM, Justiniano SV, Mendes RS, Melo AL, Alves CJ, Azevedo SS. 2013. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. *Res. Vet. Sci.* 3: 474-477.
- Thomas S, Popov VL, Walker DH. 2010. Exit mechanisms of the intracellular bacterium *Ehrlichia*. *PLoS One.* 5: 157-175
- Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen J, Frankena K. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record.* 148: 567-572.
- Thrusfield M. 2007. *Veterinary epidemiology*. 3 ed. Oxford: Blackwell Science. 610.
- Tsachev I, Gundasheva D, Kontos V, Papadogiannakis E, Denev S. 2013. Haematological profiles in canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 31 spontaneous cases in Greece. *Revue Méd. Vét.* 164: 327-330
- Trapp SM, Dagnone AS, Vidotto O, Freire RL, Amude AM, Morais HS. 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.* 140: 223–230.
- Troyo A, Calderón-Arguedas O, Alvarado G, Vargas-Castro LE, Avendaño A. 2012. Ectoparasites of dogs in home environments on the Caribbean slope of Costa Rica. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.* 2: 179-183.
- [USDHEW] U.S. Department of Health, Education, and Welfare. 1967. *Pictorial keys to arthropods, reptiles, birds and mammals of public health significance*. Atlanta, Georgia.

- Vargas-Hernández G, André MR, Faria JL, Munhoz TD, Hernandez-Rodriguez M, Machado RZ, Tinucci-Costa M. 2012. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet. Parasitol.* 186: 254-60.
- Vieira RF, Vieira TS, Nascimento Ddo A, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, Chandrashekar R, Marcondes M, Biondo AW, Vidotto O. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 5: 335-40.
- Villaescusa A, Tesouro MA, García-Sancho M, Ayllón T, Rodríguez-Franco F, Sainz A. 2012. Evaluation of lymphocyte populations in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* with and without clinical signs. *Ticks Tick Borne Dis.* 3: 279-82.
- Walker D. 1996. Rickettsiae. En S. Baron (Ed). *Medical Microbiology.* 4 ed. Texas: University of Texas.
- Walker D, Paddock C, Dumler JS. 2008. Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections. *Med. Clin. N. Am.* 92: 1345–1361.
- Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A. 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet. Parasitol.* 69: 307-3
- Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AW. 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 95: 1-15.
- Waner T, Harrus S, Weiss DJ, Bark H, Keysary A. 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48: 177-82.

- Waner T, Leykin I, Shinitzky M, Sharabani E, Buch H, Keysary A, Bark H, Harrus S. 2000. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77: 145-50.
- Wall R, Shearer D. 2001. *Veterinary ectoparasites biology, pathology and control*. 2 ed. Blackwell Science, [London].
- Weiser IB, Greene CE. 1989. Dermal necrosis associated with Rocky Mountain spotted fever in four dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195: 1756-8.
- Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, Couto GC, Unver A, Bartsch R. 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1852-1855.
- Yuasa Y, Hsu TH, Chou CC, Huang CC, Huang WC, Chang CC. 2012. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: Seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 599-606.
- Zlotorzyczka J, Eichler W, Ludwig HW. 1974. *Taxonomie und Biologie der Mallophagen und Läuse mitteleuropäischer Haus- und Nutztiere*. Parasitologische Schriftenreihe. Band. Deutschland.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Número de formulario:



UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



Proyecto de Tesis

FECHA:		LUGAR DE MUESTREO:	
FORMULARIO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS GENERALES			
Toda la información que usted brinde, será absolutamente confidencial y será de uso estricto médico-veterinario.			
INFORMACIÓN PERSONAL DEL PROPIETARIO			
Nombre del propietario:			
Lugar de habitación actual:	Provincia:	Cantón:	
Número de teléfono:	Correo electrónico:		
INFORMACIÓN PERSONAL DEL PACIENTE			
Nombre del paciente:	Raza:	Sexo:	Edad:
Lugar de habitación en el hogar:	Fuera de la casa <input type="checkbox"/>		Dentro de la casa <input type="checkbox"/>
Cantidad de animales con los que habita:		Cantidad de personas con los que habita:	
Detalle la clase de animales con los que habita: (1 gato, 2 perros, 1 caballo, etc)			
¿El paciente ha tenido alguno de los siguientes parásitos en el pasado?			
Garrapatas:	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellas?	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO ¿Con qué?
Pulgas:	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellas?	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO ¿Con qué?
Piojos:	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellos?	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO ¿Con qué?
Intestinales:	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellos?	<input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO ¿Con qué?
¿Con qué regularidad visita el parque?			

Hace años <input type="checkbox"/>	Hace meses <input type="checkbox"/>	Hace menos de 4 semanas <input type="checkbox"/>	Ésta es la primera vez <input type="checkbox"/>			
¿Alguna vez el paciente ha sido diagnosticado con EHRLIQUIOSIS (LA ENFERMEDAD DE LAS GARRAPATAS)?						
<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Hace cuánto tiempo?	¿Ha recibido tratamiento?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
¿Alguna vez su veterinario pudo tener la sospecha de que su mascota tuviera EHRLIQUIOSIS (LA ENFERMEDAD DE LAS GARRAPATAS)?						
<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Hace cuánto tiempo?	¿Recibió algún tratamiento?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
¿Alguna vez el paciente ha presentado los siguientes síntomas?						
Anorexia (pérdida del apetito)	<input type="checkbox"/>	Cualquier tipo de sangrado	<input type="checkbox"/>	Problemas respiratorios	<input type="checkbox"/>	
Fiebre	<input type="checkbox"/>	Manchas rojas en la piel	<input type="checkbox"/>	Sangre en la orina	<input type="checkbox"/>	
Debilidad	<input type="checkbox"/>	Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	Problemas para caminar	<input type="checkbox"/>	
Depresión	<input type="checkbox"/>	Inflamación en los testículos	<input type="checkbox"/>	Picazón	<input type="checkbox"/>	
Pérdida de pelo	<input type="checkbox"/>	Tumores o pelotas	<input type="checkbox"/>	Diarrea	<input type="checkbox"/>	

ANEXO 2

Número de ficha:

FICHA CLÍNICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DE PERROS EN PARQUES RECREATIVOS

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Números de muestras sanguíneas:	Rojos:		Morados:	
Número de muestra garrapatas:				
Número de muestra pulgas:				
Número de muestra piojos:				
Número de muestra heces:				

INFORMACIÓN GENERAL DEL PACIENTE

Color de pelaje:											
Condición corporal: Caquexia <input type="checkbox"/> Mala <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Buena <input type="checkbox"/> Obesidad <input type="checkbox"/>											
Actitud: Deprimido <input type="checkbox"/> Débil <input type="checkbox"/> Dócil <input type="checkbox"/> Alerta <input type="checkbox"/> Agresivo <input type="checkbox"/>											
Membranas Mucosas: Muy pálidas <input type="checkbox"/> Pálidas <input type="checkbox"/> Rosadas <input type="checkbox"/> Ictéricas <input type="checkbox"/>											
Tiempo de llenado capilar:											
Temperatura:											
Indicios de:											
						Epistaxis <input type="checkbox"/>	Petequias <input type="checkbox"/>	Equimosis <input type="checkbox"/>	Metrorragia <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis <input type="checkbox"/>	Edema escrotal <input type="checkbox"/>
						Disnea <input type="checkbox"/>	Tos <input type="checkbox"/>	Cianosis <input type="checkbox"/>	Ataxia <input type="checkbox"/>	Hematuria <input type="checkbox"/>	Alopecia <input type="checkbox"/>
Linfadenomegalia		Artritis <input type="checkbox"/>	Diarrea <input type="checkbox"/>								

GARRAPATAS	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					
PULGAS	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					
PIOJOS	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					

OBSERVACIONES ADICIONALES