

## DIAGNÓSTICO DE EHRlichIOSIS CANINA MEDIANTE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

### DIAGNOSIS OF CANINE EHRlichIOSIS BY PROTEIN ELECTROPHORESIS

ADRIANA MAYTE CHALCO ORTEGA<sup>1</sup>, MAURO NIRCHIO TURSELLINO<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias,  
 Departamento de Medicina Veterinaria, Machala, Provincia El Oro, Ecuador,

<sup>2</sup>Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Escuela de Ciencias Aplicadas al Mar,  
 Porlamar, Isla de Margarita, Venezuela

\*Correspondencia: Mauro Nirchio Tursellino , E-mail: mauro.nircho@gmail.com

#### RESUMEN

Este trabajo comparó el uso del proteinograma obtenido por electroforesis en gel de agarosa, con otros métodos en la evaluación diagnóstica de la ehrlichiosis canina. El análisis de 31 perros, a los que se les realizó una prueba de inmunocromatografía para confirmar el diagnóstico, permitió identificar 19 animales seropositivos y 12 seronegativos. Aunque la observación de mórulas y parámetros como el diámetro medio de los eritrocitos, el hematocrito, la concentración de proteínas totales y la albúmina, son fáciles de determinar y no requieren de equipos sofisticados, tienen un valor diagnóstico que se limita a pacientes con signos clínicos. Por otro lado, el análisis electroforético de suero sanguíneo utilizando el software gratuito Image J permitió un análisis densitométrico de los geles de manera fácil y rápida, y resultó ser una herramienta muy útil y económica para el diagnóstico integral en individuos con sospecha de ehrlichiosis, tanto con signos clínicos como en asintomáticos, permitiendo separar con 100% de confianza los individuos seropositivos de los seronegativos.

**PALABRAS CLAVE:** *Ehrlichia canis*, proteinograma, *Rhipicephalus sanguineus*, infección.

#### ABSTRACT

This work compares the use of the proteinogram obtained by agarose gel electrophoresis with other methods in the assessment of canine ehrlichiosis. The analysis of 31 dogs, which underwent an immunochromatography test to confirm the diagnosis, allowed the identification of 19 seropositive and 12 seronegative animals. The observation of morulae, and parameters such as mean erythrocyte diameter, hematocrit, concentration of total proteins and albumin, although they are easy to determine and do not require sophisticated equipment, have a diagnostic value that is limited to patients with clinical signs. On the other hand, the electrophoretic analysis of blood serum using the free ImageJ software allowed a densitometric analysis of the gels easily and quickly, and proved to be very useful and cheap for the comprehensive diagnosis in suspected ehrlichiosis individuals both with clinical signs as in asymptomatic ones, allowing to separate with 100% confidence the seropositive individuals from the seronegative ones.

**KEY WORDS:** *Ehrlichia canis*, proteinogram, *Rhipicephalus sanguineus*, infection.

#### INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis es una de las principales afecciones caninas infectocontagiosas producida por rickettsias (*Rickettsiae*) que incluyen a *Ehrlichia canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis* (Goodman *et al.* 2003, Straube 2010, Romero *et al.* 2011) y que pueden presentarse individualmente o como infección múltiple (Little 2010). *Ehrlichia canis* es una bacteria intracelular obligatoria de los leucocitos, Gram-negativa, presenta formas redondeadas y pleomórficas que invaden el citoplasma de la célula huésped (monocitos/macrófagos y linfocitos) donde se multiplica por fisión binaria, dando origen a un agregado o microcolonia, denominado mórula

(Tamí 2003, Straube 2010, Ferrolho *et al.* 2016) y requiere de un artrópodo, en específico, la garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*) como vector (Groves *et al.* 1975, Gutiérrez *et al.* 2016).

En la exploración médica, los caninos infectados con *E. canis* pueden presentar manifestaciones clínicas cuya intensidad está asociada a la raza, edad, alimentación, enfermedades concomitantes y virulencia de la cepa infecciosa y que según la fase de la enfermedad pueden ser leves a intensas o simplemente sin signos evidentes (Silva *et al.* 2010) lo cual impone un desafío para su diagnóstico (Salazar *et al.* 2014, Orjuela *et al.* 2015). La fase aguda tiene un periodo de incubación de aproximadamente 8 a 20 días y suele durar de 4 a 7

semanas en la que hay fiebre, anorexia, disminución de peso, depresión, petequias, lesiones a nivel ocular (uveítis, hemorragia, desprendimiento de retina, incluso puede haber ceguera), predisposición a hemorragias, hiperplasias como linfadenomegalia y esplenomegalia; así como también anemia normocítica y normocrómica, leucopenia y trombocitopenia (Harrus *et al.* 1999, Preziosi y Cohn 2002, Procajlo *et al.* 2011). Estos signos clínicos pueden variar o desaparecer espontáneamente, incluso sin tratamiento (Sainz *et al.* 2015). La fase subclínica, se caracteriza por la ausencia de sintomatología y en infecciones naturales puede durar entre 5 a 10 años (Codner y Farris-Smith 1986, Gutiérrez *et al.* 2016, Siadén 2017). Los perros que no han sido tratados oportunamente o adecuadamente pueden desarrollar esta condición y, aunque no presente signos aparentes, pueden padecer anemia no regenerativa, leucopenia y trombocitopenia moderada (Harrus *et al.* 1999, Preziosi y Cohn 2002, Procajlo *et al.* 2011). En la fase crónica es característica la hipoplasia o aplasia de la médula ósea que ocasiona una pancitopenia moderada y, generalmente, conlleva a la muerte del animal. Al igual que en la etapa aguda, puede haber hemorragias a causa de trastornos por defectos cualitativos y cuantitativos de las plaquetas (trombopatía y trombocitopenia, respectivamente) (Harrus *et al.* 1999, Preziosi y Cohn 2002, Procajlo *et al.* 2011).

Generalmente, los perros afectados en la etapa aguda suelen recuperarse con terapia adecuada; sin embargo, los animales no tratados y que llegan a recuperarse espontáneamente, pueden entrar en la fase subclínica y, aunque no existe información sobre el porcentaje de individuos con la enfermedad en esa fase, eventualmente pueden llegar a desarrollar la fase crónica (Mylonakis *et al.* 2004).

La ehrlichiosis afecta a perros domésticos, de trabajo y callejeros y, dado que tiene potencial epizootico, es una afección con importancia epidemiológica, más aun considerando el hecho de que la fase subaguda de la enfermedad es la de mayor duración y la más común lo cual contribuye con su propagación (Martínez *et al.* 2015). De hecho, estudios realizados en varios países revelan porcentajes importantes de prevalencia de esta enfermedad que oscilan entre 16,5-51,3% en Perú (Adrianzén *et al.* 2003, Huerto-Medina y Dámaso-Mata 2015), 31,66% en Colombia (Salazar *et al.* 2014), 44-49% en México (Salinas-Meléndez *et al.* 2015); 35,6% en el Nordeste de Brasil (Souza *et al.* 2010) y 77,3% en Venezuela (Martínez *et al.* 2015). Un estudio reciente en la ciudad de Machala,

Provincia del Oro, Ecuador, permitió determinar que la seroprevalencia de ehrlichiosis canina fue de 65,7% (Machicela 2020).

El diagnóstico con base en la historia clínica y la sintomatología puede orientar al médico veterinario sobre la posibilidad de una infección por *Ehrlichia* sp. pero son los datos que brindan las pruebas de laboratorio las que permiten su confirmación. Existen varios métodos para el diagnóstico de ehrlichiosis. La detección de mórulas en frotis de sangre periférica no deja dudas para el reconocimiento de la enfermedad (Rotondano *et al.* 2012) pero solo es posible visualizar esas estructuras en aproximadamente 4-6% de los casos clínicos (Mylonakis *et al.* 2003). El método de cultivo resulta poco útil y muy costoso como para emplearlo en la práctica clínica, por lo que suele ser destinado para fines de investigación (Gutiérrez *et al.* 2016). Los métodos serológicos detectan anticuerpos contra *E. canis*, mediante inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) o por inmunofluorescencia indirecta (IFI) pero en ocasiones puede conducir a generar falsos positivos ocasionando que el agente causal de la infección no sea determinado debido a la reactividad cruzada entre *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, así como con *Anaplasma phagocytophilum* (Franco-Zetina *et al.* 2019). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite amplificar genes de *E. canis* y por lo tanto es altamente sensible y especie-específica en comparación con otros métodos, permitiendo la detección de la bacteria en etapas agudas y crónicas de la enfermedad (Franco-Zetina *et al.* 2019), pero requieren de equipamiento e infraestructura de laboratorio más complejas con la que comúnmente no cuentan los servicios diagnósticos de rutina en medicina veterinaria de animales de compañía.

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica sencilla que separa, en un campo eléctrico, las fracciones de las proteínas séricas denominadas albúmina,  $\alpha 1$  globulinas,  $\alpha 2$  globulinas,  $\beta$  globulinas y  $\gamma$  globulinas (Abraham *et al.* 2013) brindando un perfil (proteinograma) cuya variación, correlacionada con signos clínicos, o con datos de otras pruebas de laboratorio puede ayudar para confirmar o descartar la sospecha de diversas patologías (Keren 2003). Sin embargo, aun cuando se ha empleado para establecer diferencias en el perfil proteínico entre perros sanos e infectados naturalmente con *Ehrlichia* (Harrus *et al.* 1996, Tappin *et al.* 2011) su uso en el diagnóstico clínico veterinario es poco frecuente debido a la necesidad

de contar con equipos de electroforesis, de densitometría y reactivos costosos.

En este trabajo se analizaron las proteinogramas del suero sanguíneo de perros identificados como seropositivos al diagnóstico de ehrlichiosis mediante inmunocromatografía, a los fines de verificar la coincidencia entre el resultado del test serológico y la variación en perfil electroforético obtenida con infraestructura mínima de laboratorio, con miras a verificar la utilidad de la electroforesis para el diagnóstico integral de la enfermedad. También se incluyen datos sobre el hematocrito, diámetro medio de los eritrocitos, concentración de proteínas totales y albúmina sérica, por ser parámetros de fácil y rápida determinación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra analizada estuvo constituida por 31 perros de distintas razas y edades con sintomatología y/o que hubiesen estado en contacto con el vector (*Rhipicephalus sanguineus*). Para obtener las muestras se realizó una campaña de atención médica veterinaria gratuita, dirigida a animales con las características anteriormente mencionadas que fue difundida por redes sociales y la radio pública.

Inmediatamente después de su evaluación clínica, a cada animal le fue extraída una muestra de 2 mL de sangre por punción de la arteria cefálica y colocada en tubos con EDTA con la que se realizó inmediatamente el diagnóstico serológico, la determinación del hematocrito y el frotis de capa blanca. La sangre restante fue centrifugada a 4500 rpm y el suero fue separado con pipeta Pasteur, colocado en criotubos de 2 mL y congelado a -80°C hasta su utilización.

Para el diagnóstico serológico se empleó el kit CVM SensPERT Ehrlichia Ab Test. Ref. AI12, un test inmunocromatográfico que tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 98%, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideraron animales aparentemente libres de *Ehrlichia canis* a los caninos cuyo resultado resultó negativo al Test SensPERT y al frotis de capa blanca.

El hematocrito se determinó por duplicado en tubos de 75 mm de largo x 1 mm de diámetro mediante centrifugación a 11.000 rpm durante 5 min. La lectura se realizó con la ayuda de una tarjeta de microhematocrito. Una vez realizada la lectura del hematocrito, se procedió a romper el

capilar justo por encima de la capa blanca y con la punta roma de una aguja de jeringa N° 21 se empujó desde la parte posterior hasta depositar la capa blanca en un extremo del portaobjetos para obtener los extendidos (frotis). Los frotis se dejaron secar al aire y luego de fijarlos con metanol 100% durante 5 minutos, fueron teñidos con colorante de Giemsa diluido al 10% en tampón fosfato, pH 6,80. A fin de hacer los frotis permanentes, éstos fueron cubiertos con barniz general Acrilex y cubiertos con cubreobjetos.

La concentración de proteínas totales (g/dL) fue cuantificada por el método de Biuret (Layne 1957), y la de albúmina (g/dL) por el método del verde de bromocresol (Doumas *et al.* 1971).

Para el fraccionamiento electroforético del suero sanguíneo se emplearon geles de agarosa (10 cm x 7 cm x 0,5 cm) al 1% en buffer Tris (90 mM) - ácido bórico (90 mM), pH 8,5. Como tampón de corrida se empleó el mismo buffer con el que fue preparado el gel. El volumen de siembra de las muestras fue de 1 µL aplicado con micropipeta de enrase automático con capacidad para 0,1-2,5 µL y se aplicó una diferencia de potencial de 100 voltios (30 mA) durante 60 minutos. Para la tinción de los geles se empleó una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0,04% diluido en ácido perclórico al 3,5%, durante 30 minutos (Reisner *et al.* 1975). Los geles fueron fotografiados a contraluz con teléfono celular y las imágenes fueron procesadas con el software libre Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) empleando la opción de análisis de geles para la obtención de los densitogramas y para medir el área de cada banda y el porcentaje que representa respecto al área total de todas las bandas.

Para establecer la existencia de diferencias estadísticas en los promedios de los parámetros analizados entre las muestras seropositivas y seronegativas se empleó el análisis *t* de Student para dos muestras independientes (Sokal y Rohlf 1987). Todos los cálculos y análisis estadísticos fueron realizados con el paquete STATGRAPHICS® Centurion XVI (versión 16.1.18).

## RESULTADOS

El empleo del Test SensPERT *Ehrlichia canis* Ab Test Kit en 31 perros que llegaron a consulta permitió establecer que 19 resultaron positivos y 12 negativos, mientras que el análisis de los frotis de capa blanca permitió identificar como positivos a *Ehrlichia*, por la presencia de mórulas (Fig. 1) sólo

10 de los 19 ejemplares seropositivos. En ninguno de los canes seronegativos se observaron mórulas.

En la Figura 2 se observan fotografías de eritrocitos (X1000) en frotis sanguíneo teñidos con Giemsa al 10%. En los caninos seronegativos al

SensPERT *Ehrlichia canis* Ab Test Kit, se observaron eritrocitos de tamaño, forma, color y palidez central normal. En caninos seropositivos macrocitosis y ausencia de palidez central eritrocitaria.

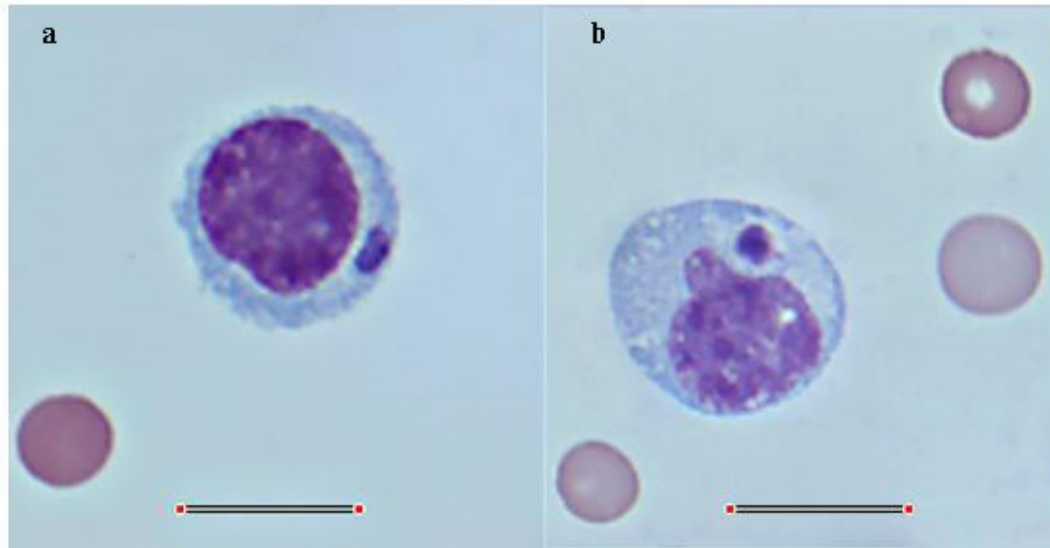


Figura 1. Monocitos con presencia de cuerpos de inclusión compatibles con *Ehrlichia canis*. Tinción Giemsa al 10%, X100.

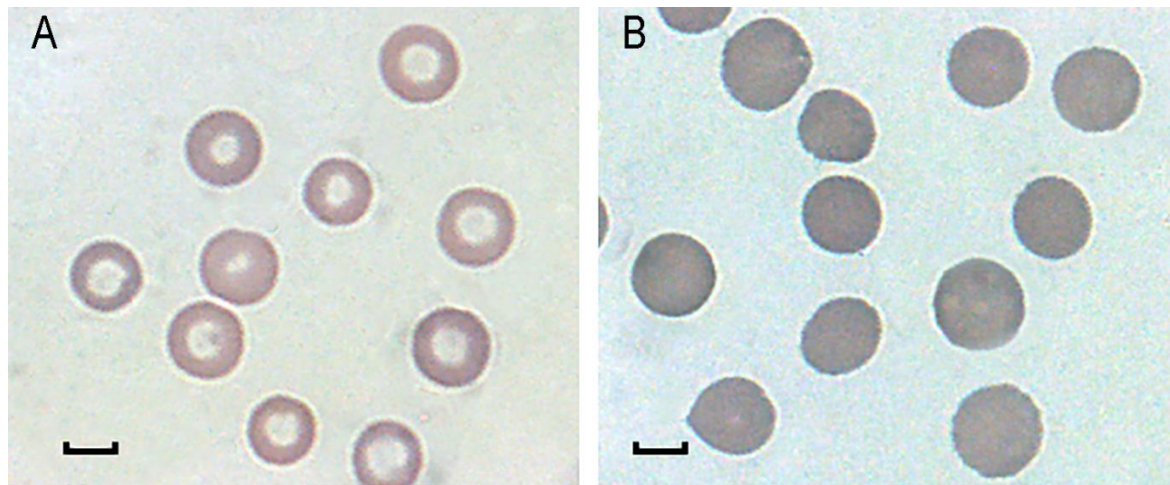


Figura 2. Fotografías de eritrocitos (X1000) en frotis sanguíneo teñidos con Giemsa al 10%, (A) Canino seronegativo al SensPERT *Ehrlichia canis* Ab Test Kit, se observan eritrocitos de tamaño, forma, color y palidez central normal. (B) Paciente seropositivo con macrocitosis y ausencia de palidez central eritrocitaria.

La Tabla 1 muestra los promedios  $\pm$  la desviación estándar, coeficiente de variación y valores mínimos y máximos para las concentraciones de proteínas totales, albúmina y globulinas, así como también para la relación albúmina/globulina (A/G), porcentaje de hematocrito y diámetro medio de los eritrocitos. Los promedios de concentración de proteína totales,

globulinas y relación A/G fueron significativamente mayores en los perros seropositivos ( $P < 0,001$ ), mientras que para la concentración de albúmina no se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de perros seropositivos y seronegativos ( $P > 0,05$ ).

Los valores de globulinas y relación A/G, resultantes de dividir la concentración de albúmina determinada por el método del verde de bromocresol entre las globulinas calculadas por diferencia de la concentración de proteínas totales (Biuret) se presenta en la Tabla 1. La concentración de globulinas fue significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) en individuos seropositivos ( $4,64 \pm 1,37$  g/dL) respecto a los seronegativos ( $2,52 \pm 1,19$  g/dL). El análisis *t* Student permitió establecer diferencias estadísticas ( $P < 0,001$ ) en el índice A/G

entre perros seropositivos ( $2,073 \pm 0,27$ ) y seronegativos ( $1,64 \pm 0,92$ ). Sin embargo, cuando se calculó la proporción A/G con base en los porcentajes que arrojó el análisis densitométrico de las corridas electroforéticas (ver más adelante) el comportamiento fue inverso: los perros seropositivos presentaron valores disminuidos ( $0,63 \pm 0,21$ ) respecto a los seronegativos ( $1,26 \pm 0,32$ ) ( $P < 0,00001$ ) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio  $\pm$  desviaciones estándar ( $X \pm \sigma$ ) de los parámetros de química sanguínea, hematocrito y diámetro medio de los eritrocitos entre especímenes negativos al test de *Ehrlichia* versus los positivos. CV% (coeficiente de variación), Min-Max (valores mínimos y máximos), *P* (*P* valor).

Parámetro	<i>Ehrlichia</i> - (N = 12)			<i>Ehrlichia</i> + (N = 19)			<i>P</i>
	$X \pm \sigma$	CV%	Min - Max	$X \pm \sigma$	CV%	Min - Max	
Proteínas (g/dL)	$6.182 \pm 1.16$	18,74	3,82 - 7,44	$7.75 \pm 1.31$	16,86	4,96 - 9,85	0,0000232***
Albúmina (g/dL)	$3,26 \pm 0,35$	10,81	2,62 - 3,80	$3,05 \pm 0,48$	15,89	1,98 - 3,96	0,903163 <sup>ns</sup>
Globulinas (g/dL)	$2,55 \pm 1,19$	46,59	0,81 - 4,08	$4,64 \pm 1,37$	29,61	2,22 - 6,94	0,0000567***
A/G (Biuret)	$1,64 \pm 0,96$	56,04	0,64 - 3,71	$0,72 \pm 0,27$	37,65	0,34 - 1,44	0,00191***
Hematocrito (Hcto %)	$33,86 \pm 8,26$	24,40	15 - 44	$31,68 \pm 5,39$	17,035	24 - 41	0,0000576***
Diámetro medio	$6,79 \pm 0,67$	9,82	4,65 - 9,55	$7,11 \pm 0,78$	10,99	4,8 - 9,85	0,0054246***

Los resultados del análisis de los perfiles electroforéticos con el software Image J se indican en la Tabla 2 y Figura 3. La electroforesis del suero sanguíneo reveló cinco fracciones: albúmina (A), alfa-1-globulina ( $\alpha$ -1), alfa-2-globulina ( $\alpha$ -2), beta-globulina ( $\beta$ ) y gamma-globulina ( $\gamma$ ), que se reprodujeron de forma consistente en todos los ejemplares analizados, aunque con variaciones de intensidad luego de la tinción, según si el suero provenía de animales seropositivos o seronegativos al test inmunocromatográfico de *E. canis*. En el lugar de depósito del suero pudo observarse la presencia de dos “picos agudos” próximos a las fracciones  $\beta$  y  $\gamma$ . Estos picos constituyen un artefacto metodológico producido por la refracción de las fracciones proteicas coloreadas, a través de las paredes anchas del pocillo de siembra, que no aparecen en los lados perpendiculares más delgados, puesto que allí no hay proteína coloreada. Estos picos se muestran resaltados en color gris en la Figura 3 y no fueron tomados en cuenta. El análisis estadístico permitió establecer diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) en los porcentajes de las fracciones de A,  $\gamma$  globulinas y en la relación A/G.

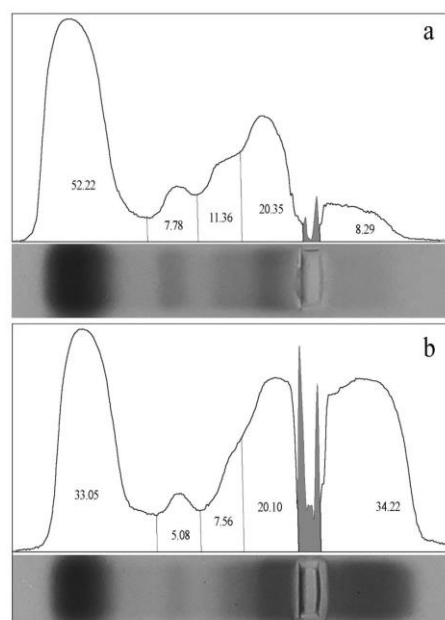


Figura 3. Perfil electroforético con sus respectivos densitogramas de muestras de suero de perros seronegativos (a) y seropositivos (b) al test SensPERT® *Ehrlichia*Test Kit (*E. canis* Ab). Los números indican el porcentaje de cada fracción. Los picos rellenos de color gris son artefactos metodológicos.

Tabla 2. Resultados de la electroforesis de proteínas séricas (%) presentados como la media  $\pm$  desviación estándar en perros seronegativos (*Ehrlichia* -) y seropositivo (*Ehrlichia* +) a *Ehrlichia canis*.

Parámetro	<i>Ehrlichia</i> - (N = 12)			<i>Ehrlichia</i> + (N = 19)			P
	X $\pm$ $\sigma$	CV%	Min - Max	X $\pm$ $\sigma$	CV%	Min - Max	
Albúmina %	54,93 $\pm$ 6,60	12,02	40,25 - 63,9	37,61 $\pm$ 7,76	20,64	21,95 - 50,28	0,00001*
Alfa 1%	10,001 $\pm$ 4,07	40,69	5,1 - 18,21	9,89 $\pm$ 3,96	39,98	3,81 - 16,2	0,9399 <sup>ns</sup>
Alfa 2%	8,35 $\pm$ 2,17	25,92	5,8 - 11,42	7,74 $\pm$ 2,14	27,63	4,8 - 11,8	0,4370 <sup>ns</sup>
Beta %	15,64 $\pm$ 4,03	25,78	10,71 - 25,36	15,05 $\pm$ 3,09	20,55	9,2 - 22,6	0,6431 <sup>ns</sup>
Gamma%	11,07 $\pm$ 3,72	33,59	6,5 - 19,49	29,71 $\pm$ 10,02	33,73	8,5 - 51,95	0,00001***
A/G %	1,26 $\pm$ 0,32	25,41	0,67 - 1,78	0,63 $\pm$ 0,21	33,58	0,28 - 1,01	0,00001***

### DISCUSIÓN

Aunque se ha indicado que el análisis de los extendidos sanguíneos de capa leucocitaria tiene una sensibilidad del 66% (Ybañez *et al.* 2018, Franco-Zetina *et al.* 2019), la visualización de microcolonias intracitoplasmáticas (mórulas) no siempre es posible debido a la transitoriedad de esa fase hemoparasitaria, excepto en la fase aguda de la enfermedad durante la cual el animal presenta hipertermia (Font Grau *et al.* 1988) y que se corresponde con la etapa en la que la bacteria se multiplica (Bai *et al.* 2017, Derakhshandeh *et al.* 2017, Ybañez *et al.* 2018, López y Soler 2020). En un estudio realizado por Faria *et al.* (2010) en 35 perros con signos clínicos de ehrlichiosis por medio de la técnica de aspiración de bazo, se observaron mórulas en el 48,6% de esos individuos mientras que, por medio de la capa leucocitaria sólo el 5,7% resultó positivo, lo que indica que la primera técnica es mucho más eficiente que la segunda, debido a que *E. canis* permanece alojada más tiempo en el bazo que en la sangre. Sin embargo, en el caso que nos ocupa, en 10 (53%) de 19 los perros seropositivos fue posible visualizar mórulas en perros que se encontraban hipertérmicos y por lo tanto en fase aguda de la enfermedad.

Otros estudios mencionan haber encontrado una reducida proporción de mórulas en los frotis de capa blanca que ha sido explicada como resultado de la baja densidad de bacterias que ocurre en una infección natural (Oliveira *et al.* 2000). En consecuencia, nuestros resultados sustentan la opinión según la cual la capacidad diagnóstica de esa técnica es limitada ya que existe la posibilidad de obtener falsos negativos y no permite

considerarla como una técnica de diagnóstico concluyente, aunque sí podría ser empleada como método de tamizaje para posteriormente realizar pruebas moleculares y/o serológica (Franco-Zetina *et al.* 2019).

Se ha sugerido que parámetros sanguíneos como el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el recuento total de eritrocitos no son buenos indicadores para el diagnóstico en perros afectados por *Ehrlichia* debido a su variabilidad (Waner *et al.* 1997). Aunque en esta investigación el promedio del hematocrito en los perros seropositivos fue menor ( $P < 0,001$ ) que en los seronegativos (Tabla 1), sólo los animales que tenían signos clínicos (fiebre, letargia, inapetencia, petequias, entre otros), entre los seropositivos, presentaron valores de hematocrito reducidos lo que explica el limitado valor de este parámetro en el diagnóstico de ehrlichiosis.

En perros, los eritrocitos maduros no tienen núcleos, presentan coloración rojiza o rojizo-anaranjada y tienen forma discoidal bicóncava con un diámetro de  $\approx 7$  micras, pero en los casos de anemias regenerativas aumenta la frecuencia de eritrocitos jóvenes de mayor tamaño, sin la palidez central que caracteriza a los eritrocitos maduros (Reagan *et al.* 1999), condición que representa una alteración de los eritrocitos que se observa en cuadros anémicos por pérdida de sangre y/o hemólisis (Aguiló 2001) y que requiere, en compensación, una eritropoyesis acelerada con liberación de formas inmaduras de estas células desde la médula ósea hasta la sangre periférica (Weiss y Jane Wardrop 2011, Grandía *et al.* 2020). Esta condición (macrocitosis) fue observada en

aproximadamente el 50% de los canes seropositivos (Fig. 2), precisamente aquellos con manifestaciones clínicas. De hecho, el promedio del diámetro medio de los eritrocitos en los perros seropositivos fue mayor ( $7,11 \pm 0,78 \mu\text{m}$ ) que el de los seronegativos ( $6,79 \pm 0,67 \mu\text{m}$ ) y la prueba *t* Student demostró diferencias estadísticamente significativas entre estos promedios confirmando un cuadro de macrocitos en individuos seropositivos (Tabla 1). Sin embargo, debido a que los límites mínimos y máximos se solapan, el diámetro medio de los eritrocitos resulta ser un parámetro cuya utilidad diagnóstica para ehrlichiosis se limita a los pacientes sintomáticos.

Los perros seropositivos presentaron valores promedio de proteínas totales ( $7,75 \pm 1,31 \text{ g/dL}$ ) mayores a los de los seronegativos ( $6,182 \pm 1,16 \text{ g/dL}$ ), lo que indica un aumento porcentual de proteínas de 32% en los primeros. Estos valores caen dentro del rango que ha sido reportado en estudios similares (Harrus *et al.* 1996) y el incremento porcentual aquí detectado es similar al incremento reportado de 33% en las proteínas totales en suero de perros infectados naturalmente por *Ehrlichia* (Waner *et al.* 1997).

El análisis estadístico de la concentración de albúmina, cuantificada con el método del verde de bromocresol, no reveló diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre perros seronegativos ( $3,26 \pm 0,35 \text{ g/dL}$ ) y seropositivos ( $3,05 \pm 0,48 \text{ g/dL}$ ) y los promedios se encuentran dentro del intervalo de 1,3 - 4,6 g/dL, similares al promedio de  $2,9 \pm 0,83 \text{ g/dL}$  reportado para caninos de ambos sexos, de diferente edad y pertenecientes a 48 razas (Castellanos y Castellano 2010).

Es conocido que la reacción del verde de bromocresol con otras proteínas distintas a la albúmina puede generar resultados alterados que pueden conducir a diagnosticar elevadas concentraciones de albúmina cuando en realidad éstas se encuentran dentro de límites normales o bajos (Nuñez y Bouda 2007), lo que podría explicar la ausencia de diferencias de este parámetro entre los perros analizados. También es importante tener en consideración que patologías que implican variaciones sustanciales de albúmina son atribuidas a causas multifactoriales, entre ellas: la disminución de su síntesis, generalmente asociada a la presencia de enfermedades como la insuficiencia hepática, inflamación severa o una nutrición inadecuada (aguda o crónica), pérdidas de proteínas, redistribución al espacio extravascular, dilución en el compartimento intravascular (Torrente Artero

2014). Por lo tanto, con base en los resultados aquí expuestos, la simple determinación cuantitativa de albúmina por colorimetría tuvo un valor diagnóstico limitado.

Estos resultados permiten suponer que la ambigüedad entre los valores de A/G obtenidos por colorimetría y mediante electroforesis pudieran resultar de la sobreestimación de la albúmina por el método del verde de bromocresol antes señalada y, en consecuencia, el valor más adecuado para asociar las variaciones de la relación A/G con la seropositividad a *Ehrlichia canis* es el obtenido mediante electroforesis. El incremento porcentual de las fracciones de las gammaglobulinas observado en las corridas electroforéticas (ver más adelante) explicaría la disminución de la relación A/G en los perros seropositivos reflejando un estado de estimulación inmune crónica.

El análisis densitométrico de las corridas electroforéticas con el software Image J, permitió visualizar y cuantificar variaciones notables de las fracciones correspondientes a albúmina y  $\gamma$  globulinas. En el caso de los canes seronegativos al test de *E. canis* por inmunoadsorción, la fracción de  $\gamma$  globulinas presentó poca elevación, base ancha y pendientes suaves mientras que en los ejemplares seropositivos esa fracción se evidenció como una curva muy elevada, de base ancha y pendientes pronunciadas, compatible con las curvas electroforéticas que corresponden a hipergammaglobulinemia de morfología policlonal (Cienfuegos Rodríguez y Sánchez 2017).

El término hiperglobulinemia, también denominado gammapatía, se refieren el aumento de la fracción  $\gamma$  que agrupa cinco tipos de globulinas implicadas en procesos inmunes (IgA, IgG, IgM, IgE e IgD), y refleja una respuesta exagerada a diversas causas como infecciones, neoplasias, atopias y enfermedades autoinmunes, produciendo gran cantidad de anticuerpos (Abraham *et al.* 2013) y es una de las principales alteraciones detectadas en el perfil electroforético de caninos infectados con *E. canis* (Burghen *et al.* 1971, Weisiger 1975, Harrus *et al.* 1996, 1999), aparece desde la primera a la tercera semana postinfección (Buhles *et al.* 1974, Greene y Harvey 1984, Rodríguez *et al.* 1995), como una fracción heterogénea ancha, generalmente de movilidad  $\gamma$  o  $\beta$ - $\gamma$ , indicadora de hipergammaglobulinemia policlonal aunque rara vez puede ser monoclonal (Gutiérrez *et al.* 2016, Boban *et al.* 2017).

Al parecer existe consenso en que no hay una relación proporcional entre la magnitud de la hiperglobulinemia y los títulos de anticuerpos específicos frente *E. canis*, sino más bien con la duración de la infección, lo que permite suponer la producción de anticuerpos inespecíficos inducida por *E. canis* (Burghen *et al.* 1971, Weisiger *et al.* 1975, Reardon y Pierce 1981, Harrus *et al.* 1996). Este fenómeno también se ha verificado en otras enfermedades con estimulación antigénica prolongada (Tizard 2009) y sugiere una respuesta inmunológica exacerbada pero inefectiva frente a *E. canis* (Reardon y Pierce 1981). Por la tanto, debido a que el título elevado de anticuerpos persiste después del tratamiento con tetraciclinas, pero no la hipergammaglobulinemia (Buhles *et al.* 1974, Font Grau *et al.* 1988), la determinación del perfil electroforético resultaría ser una herramienta valiosa para seguir la evolución de la enfermedad durante y luego del tratamiento indicado por el médico veterinario, considerando que se ha reportado que las variaciones del perfil electroforético y los valores de la albúmina y de las globulinas requieren de 3-9 meses para normalizarse, aunque existen casos que tardan hasta 12 meses en hacerlo (López *et al.* 2012).

Es importante recalcar que la técnica electroforética aquí empleada tiene un tiempo de ejecución de no más de 60 minutos desde el momento en que se aplica la diferencia de potencial al gel, y el colorante empleado requiere de 30 minutos para revelar las fracciones de proteínas y, aunque es suficiente solo un lavado con fijador durante una hora para reducir el background que se forma en el gel de agarosa, un segundo lavado produce una mayor transparencia del gel. Además, permite analizar simultáneamente varias muestras (12-24 muestras), dependiendo de las dimensiones del gel. Otro aspecto importante es que no se requiere de equipos ni softwares costosos de análisis densitométrico debido a que el software empleado es de distribución libre y demostró tener la suficiente sensibilidad para el análisis a partir de fotografías que pueden ser tomadas con los actuales teléfonos celulares que disponen de cámaras con gran sensibilidad.

### CONCLUSIONES

En conclusión, si bien la observación de mórulas en frotis de capa blanca, la medición del diámetro medio de los eritrocitos y la determinación del hematocrito, al igual que la cuantificación de proteínas totales y albúmina por métodos colorimétricos, son métodos fáciles de realizar que

no requieren equipamiento sofisticado, los indicadores que brindan poseen un valor diagnóstico que se limita a los pacientes con signos clínicos. Por otro lado, el análisis electroforético del suero sanguíneo, empleando un software libre, permite un análisis densitométrico de los geles de manera fácil y rápida y es una alternativa útil para el diagnóstico integral ante la sospecha de ehrlichiosis tanto en individuos con signos clínicos como en aquellos asintomáticos, ya que permitió separar con 100% de coincidencia los individuos seropositivos de los seronegativos con inmunocromatografía.

### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador (Proyecto GPR-GEN-155).

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM RS, BARNIDGE DR, LANZA IR. 2013. Assessment of proteins of the immune system. *In: RICH RR. et al.* (Eds.), *Clinical Immunology*, Fourth Edition. Elsevier, London, UK, pp. 1145-1159. doi: 10.1016/B978-0-7234-3691-1.00106-9.
- ADRIANZÉN GJ, CHÁVEZ AV, CASAS AE, LI EO. 2003. Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Rev. Investig. Vet. Peru.* 14(1):43-48.
- AGUILÓ BJ. 2001. Valores hematológicos. *Clin. Vet. Pequeños Anim.* 21(2):75-85.
- BAI L, GOEL P, JHAMBH R, KUMAR P, JOSHI VG. 2017. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in and around Hisar, Haryana, India. *J. Parasit. Dis.* 41(3):647-654.
- BOBAN MJ, DE ELÍAS R, KIENER O, KIENER G, JARMI V, BARZÓN S. 2017. Evaluación de la zona gamma del proteinograma por electroforesis: correspondencia clínico-patológica. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 51(2):213-220.
- BUHLES WC, HUXSOLL DL, RISTIC M. 1974. Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *J. Infect. Dis.* 130(4):357-367.



- BURGHEN GA, BEISEL WR, WALKER JS, NIMS RM, HUXSOLL DL, HILDEBRANDT PK. 1971. Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *Am. J. Vet. Res.* 32(5):749-756.
- CASTELLANOS R, CASTELLANO A. 2010. Estudio de valores referenciales para bioquímica sérica en población canina de la Parroquia San José, Distrito Valencia, estado Carabobo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria.* 11(5):1-20.
- CIENFUEGOS RODRÍGUEZ AÁ, SÁNCHEZ MIT. 2017. Electroforesis de proteínas plasmáticas: proteinograma. *Rev. Soc. Val. Rem.* 7(1):5-7.
- CODNER EC, FARRIS-SMITH LL. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189(1):47-50.
- DERAKHSHANDEH N, SHARIFIYAZDI H, ABBASZADEH HASIRI M. 2017. Molecular detection of *Ehrlichia* spp. in blood samples of dogs in southern Iran using polymerase chain reaction. *Vet. Res. Forum.* 8(4):347-351.
- DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG. 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta.* 31(1):87-96.
- FARIA JLM, DAGNONE AS, MUNHOZ TD, JOÃO CF, PEREIRA WAB, MACHADO RZ, TINUCCI M. 2010. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Rev. Bras. Parasit. Vet.* 19(02):98-102.
- FERROLHO J, SIMPSON J, HAWES P, ZWEYGARTH E, BELL-SAKYL L. 2016. Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. *Ticks Tick-borne Dis.* 7(4):631-637.
- FONT GRAU J, CAIRÓ VILAGRAN J, CALLÉS A. 1988. Ehrlichiosis canina. *Clin. Vet. Pequeños Anim.* 8(3):0141-0148.
- FRANCO-ZETINA M, ADAME-GALLEGOS J, DZUL-ROSAO K. 2019. Effectivity of diagnostic methods for the detection of human and canine monocytic ehrlichiosis. *Rev. Chilena Infectol.* 36(5):650-655.
- 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(8):1102-1107.
- GRANDÍA GR, FUENTES SR, PÉREZ PJ, HERNÁNDEZ AJ, CASTILLO EM, ANICAMA AW, CABALLERO CJ, ROJAS CL, GALINDO JI, DÍAZ ML, FIMIA-DUARTE R. 2020. Hallazgos hematológicos en perros y gatos en Lima, Perú. *Rev. Investig. Vet. Peru.* 30(4):1395-1413.
- GREENE CE, HARVEY JW. 1984. Canine ehrlichiosis. In: GREENE CE. (Ed). *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat.* WB Saunders Co., Philadelphia, USA, pp. 545-561.
- GROVES MG, DENNIS GL, AMYX HL, HUXSOLL DL. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36(7):937-940.
- GUTIÉRREZ CN, PÉREZ-YABARRA L, AGRELA IF. 2016. Ehrlichiosis canina. *Saber.* 28(4):641-665.
- HARRUS S, WANER T, AVIDAR Y, BOGIN E, PEH H, BARK H. 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* 66(3-4):241-249.
- 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(9):2745-2749.
- HUERTO-MEDINA E, DÁMASO-MATA B. 2015. Factores asociados a la infección por *Ehrlichia canis* en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 32(4):756-760.
- KEREN D. 2003. Protein electrophoresis in clinical diagnosis. CRC Press, Edward Arnold (Publisher) LTD, New York, USA, pp. 422.
- LAYNE E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: COLOWICK PS, KAPLAN NO. (Eds.). *Method in enzymology.* Academic Press, Inc., New York, USA, pp. 447-454.
- LITTLE SE. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40(6):1121-1140.

- LÓPEZ J, ABARCA K, MUNDACA MI, CABALLERO C, VALIENTE-ECHEVERRÍA F. 2012. Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile. Rev. Chil. Infect. 29(5):527-530.
- LÓPEZ RAP, SOLER TD. 2020. Ehrlichiosis canina y su contextualización en Colombia. En: Enfermedades rickettsiales en Latinoamérica. Fondo Editorial Biogénesis. Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia, pp. 68-83.
- MARTÍNEZ M DEL C, ARRAGA-ALVARADO CM, TRIANA-ALONSO FJ, RUIZ JA, GUTIÉRREZ CN. 2015. Estudio serológico y molecular de *Ehrlichia canis* en perros de una comunidad del estado Aragua, Venezuela. Rev. Investig. Vet. Peru. 26(4):648-656.
- MYLONAKIS ME, KOUTINAS AF, BILLINIS C, LEONTIDES LS, KONTOS V, PAPADOPOULOS 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(2-3):197-204.
- MYLONAKIS ME, KOUTINAS AF, BREITSCHWERDT EB, HEGARTY BC, BILLINIS CD, LEONTIDES LS, KONTOS VS. 2004. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 40(3):174-184.
- NUÑEZ L, BOUDA J. 2007. Patología clínica veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, pp. 348.
- OLIVEIRA D, NISHIMORI CT, COSTA MT, MACHADO RZ, CASTRO MB. 2000. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by «Dot-ELISA» in naturally infected dogs. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 9(1):1-5.
- ORJUELA CJA, GARCÍA GF, IMBACHI JG. 2015. Análisis epidemiológico de la presentación de *Ehrlichia* sp. en caninos de Florencia Caquetá, Colombia. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 16(6):1-10.
- PREZIOSI DE, COHN LA. 2002. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. Compend. Contin. Educ. Vet. 24(4):277-291.
- PROCAJLO A, SKUPIEŃ E, BLADOWSKI M, LEW S. 2011. Monocytic ehrlichiosis in dogs. Pol. J. Vet. Sci. 14(3):515-520.
- REAGAN W, SANDERS T, DE NICOLA D. 1999. Hematología veterinaria: atlas de las especies domésticas comunes. Ediciones S, Barcelona, España, pp. 75.
- REARDON MJ, PIERCE KR. 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. Vet. Pathol. 18(1):48-61.
- REISNER AH, NEMES P, BUCHOLTZ C. 1975. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 64(2):509-516.
- RODRÍGUEZ M, MASSARD CL, DA FONSECA AH, RAMOS NF, MACHADO H, LABARTA V, DE LA FUENTE J. 1995. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. Vaccine. 13(18):1804-1808.
- ROMERO LE, MENESES AI, SALAZAR L, JIMÉNEZ M, ROMERO JJ, AGUIAR DM, LABRUNA MB, DOLZ G. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. Res. Vet. Sci. 91(1):95-97.
- ROTONDANO TE DE F, DE ALMEIDA AMP, LUSTOSA EMC, CORDEIRO AA, CAMBOIM EKA, DE AZEVEDO SS, DE ANDRADE PP, DE MELO MA. 2012. An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. Sci. World J. Article ID 605743:1-6, doi:10.1100/2012/6057431-6.
- SAINZ Á, ROURA X, MIRÓ G, ESTRADA-PEÑA A, KOHN B, HARRUS S, SOLANO-GALLEGO L. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit. Vectors. 8:75. doi: 10.1186/s13071-015-0649-0.
- SALAZAR H, BURITICÁ EF, ECHEVERRY DF, BARBOSA IX. 2014. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). Rev. Colomb. Cienc. Animal. 7(1):56-63.

- SALINAS-MELÉNDEZ JA, CANTÚ-MARTÍNEZ MA, WONG-GONZÁLEZ A, HERNÁNDEZ-ESCAREÑO JJ, ÁVALOS-RAMÍREZ R, ZÁRATE-RAMOS JJ, RIOJAS-VALDÉS VM. 2015. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs from Monterrey, Mexico. Afr. J. Microbiol. Res. 9(35):1974-1977.
- SILVA JN, FERREIRA AAB, BOA SORTE EC, FREITAS AG, FERREIRA SLG, AGUIAR DM, FRANCO SVR. 2010. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19(2):108-111.
- MACHICELA SJB. 2020. Seroprevalencia de ehrlichiosis monocítica canina, en perros con signología clínica de enfermedad en la ciudad de Machala. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias [Disertación Grado Médico Veterinario], pp. 49.
- SIADÉN PMG. 2017. Perfil de las proteínas sanguíneas en perros positivos con *Ehrlichia canis*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de Medicina Veterinaria [Disertación Grado Médico Veterinario], pp. 76.
- SOKAL RR, ROHLF FJ. 2009. Introduction to biostatistics. Dover Publications, Mineola, New York, USA, pp. 384.
- SOUZA BMP DA S, LEAL DC, BARBOZA DCPM, UZÉDA RS, DE ALCÁNTARA AC, FERREIRA F, LABRUNA MB. 2010. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19(2):89-93.
- STRAUBE J. 2010. Canine ehrlichiosis-from acute infection to chronic disease. Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany. Disponible en línea en: <http://www.cvbd.org/en/home/cvbd-digestarticles> (Acceso: 25.02.2016).
- TAMÍ I. 2003. Ehrlichiosis humana: *Ehrlichia trombocítica* en sangre periférica. Rev. Soc. Venez. Microbiol. 23(2):135-141.
- TAPPIN SW, TAYLOR SS, TASKER S, DODKIN SJ, PAPASOULIOTIS K, MURPHY KF. 2011. Serum protein electrophoresis in 147 dogs. Vet. Rec. 168(17):456. doi: 10.1136/vr.d88.
- TIZARD IR. 2004. Veterinary immunology: An introduction. Saunders, Missouri, USA, pp. 494.
- TORRENTE ARTERO C. 2014. Aspectos diagnósticos y pronósticos de la concentración de albúmina en el paciente canino con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Barcelona, España: Universitat Autònoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria [Disertación Grado Doctor en Veterinaria], pp. 168.
- WANER T, HARRUS S, BARK H, BOGIN E, AVIDAR, KEYSARY A. 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. Vet. Parasitol. 69(3-4):307-317.
- WEISIGER RM, RISTIC M, HUXSOLL DL. 1975. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. Am. J. Vet. Res. 36(5):689-694.
- WEISS DJ, JANE WARDROP K. 2011. Schalm's Veterinary Hematology. John Wiley & Sons, Hoboken, Nueva Jersey, USA, pp. 1232.
- YBAÑEZ RHD, YBAÑEZ AP, ARNADO LLA, BELARMINO LMP, MALINGIN KGF, CABILETE PBC, AMORES ZRO, TALLE MG, LIU M, XUAN X. 2018. Detection of *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Babesia* spp. in dogs of Cebu, Philippines. Vet. World. 11(1):14-19.