

EHRlichiosis CANINA

CANINE EHRlichiosis

CLARA NANCY GUTIÉRREZ^{1,2}, LUIS PÉREZ-YBARRA^{1,3}, IRMA FÁTIMA AGRELA^{1,2}

Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, ¹Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas "Dr. Carlos Palacios", ²Departamento de Microbiología, ³Departamento de Ciencias Básicas, Maracay, Venezuela
E-mail: claranancy@gmail.com

RESUMEN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad infecciosa emergente transmitida por garrapatas, producida por *Ehrlichia* spp. (Proteobacteria: Rickettsiales), la cual afecta a miembros de la familia Canidae. Los agentes etiológicos son bacterias Gram negativas, intracelulares obligatorias, redondeadas y pleomórficas, esto último especialmente en cultivos celulares. Estas bacterias se localizan en vacuolas rodeadas de membranas (mórulas) en el citoplasma de células sanguíneas y dependiendo de la especie, tienen tropismo por linfocitos, monocitos y granulocitos. Históricamente la enfermedad es endémica en regiones tropicales y subtropicales, pero se reporta cada vez más en regiones de clima templado. Ello puede atribuirse a varios factores, los cuales incluyen el mejoramiento en las herramientas de diagnóstico, los cambios ambientales y climáticos (calentamiento global) que influyen directamente en la distribución de las garrapatas y la gran cantidad de viajes con mascotas de un lugar a otro del planeta, lo cual ha contribuido al establecimiento de esta enfermedad en áreas no endémicas. Es común la presencia de coinfección con otros patógenos transmitidos por garrapatas y esto complica la patogénesis, las manifestaciones clínicas, el diagnóstico y el tratamiento. Frecuentemente, el patógeno no puede ser eliminado por completo a pesar de la terapia con antibióticos y la resolución de los signos clínicos. Actualmente, no se dispone de una vacuna, por lo que el uso de ectoparasiticidas resulta ser una buena opción para la prevención de la enfermedad. Esta enfermedad constituye un problema en medicina veterinaria y el potencial zoonótico de estos agentes es una consideración de gran relevancia para la salud humana.

PALABRAS CLAVE: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, perro, ehrlichia, zoonosis, rickettsia.

ABSTRACT

Canine ehrlichiosis is an emerging infectious disease transmitted by ticks, caused by *Ehrlichia* spp. (Proteobacteria: Rickettsiales), which affects members of the family Canidae. The etiological agents are Gram-negative, obligate intracellular, rounded, and pleomorphic bacteria, the latter especially in cell cultures. These bacteria are localized in vacuoles surrounded by membranes (morulae) in the blood cells cytoplasm, and depending on the species, have a tropism for lymphocytes, monocytes and granulocytes. Historically the disease is endemic to tropical and subtropical regions, but is reported increasingly in temperate climate regions. This can be attributed to several factors, which include the improvement in diagnostic tools, environmental and climate change (global warming) that directly influence the distribution of ticks, and the large number of travels with pets from one place to another in the planet, which has contributed to the establishment of this disease in non-endemic areas. Co-infection with other tick-borne pathogens is common and this complicates the pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and treatment. Often, the pathogen cannot be completely eliminated despite antibiotic therapy and resolution of clinical signs. Currently, there is no vaccine available, making the use of ectoparasiticide to be a good choice for the prevention of the disease. This disease is a problem in veterinary medicine and zoonotic potential of these agents is a consideration of great importance to human health.

KEY WORDS: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, dog, ehrlichia, zoonosis, rickettsia.

INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis canina puede ser causada por *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffeensis* (Goodman *et al.* 2003, Straube 2010, Romero *et al.* 2011); se puede presentar coinfección con estos agentes y otros patógenos transmitidos por garrapatas (Little 2010). Desde el año 2001, las bacterias del género *Ehrlichia* pertenecen al grupo alfa-proteobacteria, orden

Rickettsiales y familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.* 2001, Bowman 2011). El orden Rickettsiales también comprende a la familia Rickettsiaceae y una diferencia biológica entre ambas familias consiste en que las bacterias de la familia Anaplasmataceae se multiplican dentro de vacuolas rodeadas de membranas mientras que los miembros de la familia Rickettsiaceae lo hacen libres en el citoplasma de la célula huésped (Rikihisa 2010a).

En 1935, Donatien y Lestoquard del Instituto Pasteur de Argelia visualizaron en monocitos de perros febriles y con anemia, organismos semejantes a rickettsias, por lo que fueron clasificados como *Rickettsia canis*. En 1945, Moshovski los reclasificó como *Ehrlichia canis* en honor a Paul Ehrlich, bacteriólogo alemán, con lo que se estableció un género diferente a *Rickettsia* (Ristic y Huxsoll 1984, McDade 1990).

En el hemisferio occidental, Bool y Sutmöller (1957), identificaron el primer caso de infección por *E. canis* en frotis sanguíneos de perros en la isla de Aruba. En Estados Unidos para el año de 1962, Ewing (1963), visualizó a *E. canis* en leucocitos vistos en frotis sanguíneos de perros y fue considerada un patógeno de importancia veterinaria después de los brotes epizooticos en perros militares ingleses en Singapur en 1963 y en perros militares de Estados Unidos en Vietnam en 1968, que resultó con la muerte de aproximadamente 200 animales (Huxsoll *et al.* 1970, Bavaro *et al.* 2005, Mavromatis *et al.* 2006). Desde entonces se ha reportado una alta morbilidad y mortalidad entre perros domésticos y otros miembros de la familia Canidae en países de todas partes del mundo, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales del planeta, esto en concordancia con la presencia de la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Harrus *et al.* 1999, Ferrolho *et al.* 2016).

Para el año de 1971, Ewing *et al.* describieron una nueva cepa de *E. canis*, la cual fue visualizada en granulocitos (principalmente neutrófilos) y el perro tenía una forma leve de ehrlichiosis canina. Anderson *et al.* (1992) después de análisis genéticos concluyeron que era otra especie a la que nombraron *Ehrlichia ewingii*, en honor a Sidney Ewing por su trabajo pionero con este agente.

En este mismo país, en el año 1986, Maeda *et al.* (1987) reportaron el primer caso de ehrlichiosis monocítica humana al observar en el frotis sanguíneo de un paciente febril, cuerpos de inclusión intraleucocitarios. Para ese momento se pensó que podría tratarse de *E. canis* por la semejanza morfológica, ultraestructural y por la reacción positiva del suero de este paciente con antígeno de *E. canis*, pero luego Anderson *et al.* (1991) después de analizar la secuencia del gen ARNr 16S demostraron que era una especie diferente, a la que propusieron con el nombre de *Ehrlichia chaffeensis*. Esta especie también puede infectar a perros y el primer reporte fue en Estados Unidos (Dawson *et al.* 1996). Dada la importancia epidemiológica por afectar a perros domésticos, de trabajo y callejeros, y dado su potencial epizootico, en la presente revisión se tratan las

enfermedades ocasionadas por estos tres agentes en perros.

Ehrlichia canis

Ehrlichia canis es el agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica canina (EMC), enfermedad multisistémica grave y a veces fatal que afecta a miembros de la familia Canidae, la cual incluye a los perros, lobos, coyotes y zorros; predominantemente a los perros y es transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Straube 2010, Faria *et al.* 2011, Waner y Harrus 2013, Ferrolho *et al.* 2016). *E. canis* tiene una distribución cosmopolita, incluyendo Asia, África, Europa y las Américas, siendo más frecuente en las zonas tropicales y subtropicales; al parecer Australia y Nueva Zelanda están libres de la infección por *E. canis* (Kelly 2000, Mason *et al.* 2001, Harrus *et al.* 2012).

En 1996, se reportó la primera infección humana con *E. canis*, y se logró el aislamiento en cultivo celular y la caracterización genética a partir de un humano aparentemente asintomático con infección crónica del estado Lara, Venezuela; a esta cepa la denominaron *Ehrlichia* humana venezolana (Perez *et al.* 1996, Unver *et al.* 2001). Luego en 2006, se reportó una serie de casos (6 individuos de 20; 30%) de pacientes del estado Lara con signos clínicos de ehrlichiosis monocítica humana, y se detectó *E. canis* por Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés "Polymerase Chain Reaction") (Perez *et al.* 2006), por lo tanto *E. canis* ha sido considerada en la última década como un patógeno con potencial zoonótico (Sosa-Gutiérrez *et al.* 2013).

La enfermedad producida por *E. canis* en perros, también se conoce como pancitopenia tropical canina, fiebre hemorrágica canina, rickettsiosis canina, tifus por garrapata canina y enfermedad del perro rastreador (Price y Sayer 1983, Harrus *et al.* 1997a). Esta enfermedad no tiene predilección por la edad o el sexo y pone en peligro los sistemas orgánicos del huésped de manera diferente y con distintos grados de severidad (Munhoz *et al.* 2012, Da Silva *et al.* 2013). *E. canis* invade y se multiplica en linfocitos y monocitos/macrófagos de mamíferos hospedadores (Straube 2010, Ferrolho *et al.* 2016). Esta bacteria al igual que los demás miembros de la familia Anaplasmataceae presenta tres estadios diferentes: cuerpos elementales (unidad bacteriana), cuerpos iniciales y mórulas. Los cuerpos elementales o células de centro denso (CD) son las formas maduras infectantes extracelulares, las cuales miden de 0,4 a 0,6 μm de

diámetro. Estos elementos se adhieren a la superficie de la célula diana y entran por endocitosis mediada por caveolas (bolsas celulares lipídicas). Dentro de la célula huésped, las bacterias se desarrollan dentro de la vacuola rodeada de membrana plasmática celular, donde crean un nicho para la supervivencia y la reproducción. Las formas CD se transforman en unas formas intermedia IM1 y subsecuentemente pasa al cuerpo reticular o CR (0,4-0,6 μm de ancho por 0,7-1,9 μm de largo). La forma CR se multiplica por fisión binaria, incrementando en número y forman inclusiones citoplasmáticas inmaduras de 1,0 a 2,5 μm de diámetro, denominadas cuerpos iniciales. Después se transforman en unas formas intermedias IM2 hasta formar las mórulas (vacuola con 20 a 40 cuerpos elementales), las cuales pueden observarse en el microscopio de luz óptico como inclusiones intracitoplasmáticas que se colorean de azul con las coloraciones tipo Romanowski (generalmente la coloración rápida de Diff-Quik o Hemacolor). Las mórulas pueden ser redondas y miden aproximadamente de 4 a 6 μm de diámetro o también pueden ser ovaladas y son las formas características utilizadas para el diagnóstico microscópico. Después de unos pocos días, los cuerpos elementales se liberan de la vacuola y quedan libres fuera de la célula para iniciar un nuevo ciclo infeccioso (Rikihisa 2006, Zhang *et al.* 2007, Straube 2010, Procajlo *et al.* 2011, Moumène y Meyer 2015).

Patogenia y patología

La patogénesis de la EMC involucra efectos directos del patógeno y mecanismos secundarios indirectos de la respuesta inmune (Harrus 2015). La infección del perro ocurre cuando las garrapatas infectadas ingieren sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio donde se alimenta (Procajlo *et al.* 2011). La saliva de la garrapata contiene una variedad de moléculas anticoagulantes, antiinflamatorias e inmunoreguladoras que facilitan la adquisición y transmisión del patógeno (Day 2011, Hajdušek *et al.* 2013).

La bacteria intracelular obligatoria como lo es *E. canis* ha desarrollado varios mecanismos que aseguran la evasión de la respuesta inmune del huésped. Estos mecanismos abarcan adaptaciones para la supervivencia en diferentes compartimientos celulares. Los procesos de adhesión, internalización, proliferación, exocitosis y propagación intercelular de *Ehrlichia* spp. con la participación de diferentes vías de señalización culminan con la adquisición de nutrientes, evasión lisosomal y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped (Rikihisa 2010a,

Mathema *et al.* 2013, Alves *et al.* 2014, Harrus 2015). *E. canis* replica en vacuolas rodeadas de membranas de la célula hospedadora aisladas y protegidas del sistema inmune, los lisosomas y las especies reactivas del oxígeno (Harrus *et al.* 2012).

Los monocitos/macrófagos y neutrófilos expresan en su membrana receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll y en su citoplasma se encuentra el receptor dominio de oligomerización unido a nucleótido (NOD). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) como el lipopolisacárido (LPS) y el peptidoglicano. Tales uniones provocan una respuesta por parte de la inmunidad innata de la célula, con la consecuente eliminación del patógeno (Rikihisa 2006). Los hemocitos de las garrapatas también reconocen estos PMAPs y se activa la inmunidad innata de los vectores para eliminar los microorganismos (Pereira *et al.* 2001). Estudios realizados con *E. chaffeensis* y *E. phagocytophilum* han demostrado que a diferencia de *Rickettsia* spp. y de la mayoría de las bacterias Gram negativas, les faltan los genes que codifican el LPS y el peptidoglicano de la pared celular, por lo tanto estas bacterias deben incorporar el colesterol derivado de las membranas de las células huésped para garantizar la integridad de su membrana. La ventaja de no poseer LPS y peptidoglicano es que se inhibe la unión de estos ligandos a los receptores, por lo que tanto los leucocitos hospedadores como los hemocitos de las garrapatas no se activan para eliminar al microorganismo. La pérdida de estos genes en *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* ha facilitado la adaptación de estas bacterias a las células leucocíticas y las de la garrapata vector (Rikihisa 2010a,b, 2015).

Los patógenos de la familia Anaplasmataceae poseen una gran variedad de proteínas de superficie que incluyen adhesinas e invasinas, las cuales participan en la adhesión y entrada a las células hospedadoras. En *E. chaffeensis* se ha observado que la invasina EtpE participa en la adhesión y entrada a las células de mamíferos. Esta proteína de membrana se une al glicosilfosfatidilinositol (GFI) unido a proteínas dentro de las caveolas en la superficie celular del monocito (Moumène y Meyer 2015, Rikihisa 2015). Se ha observado que después de la internalización *E. chaffeensis* queda contenida en vacuolas que se convierten en los endosomas tempranos expresando las proteínas Rab5A y el antígeno 1 endosomal temprano (EEA1), se acumula transferrina y el receptor de la transferrina (RTr), el cual durante el desarrollo del endosoma temprano contribuye a adquirir hierro

de la célula hospedadora. En etapas más tardías desaparece EEA1, aparece Rab7, se mantiene Rab5A, los RTr y faltan las proteínas lisosomales, indicando que las inclusiones se encuentran en las etapas finales del endosoma. Se ha demostrado en las células de la línea celular continua DH82 infectadas con *E. chaffeensis* que el endosoma tardío se caracteriza por poseer la proteína Rab7 y la vacuola está acidificada a pH 5,2. Esta acidificación puede ser necesaria para la supervivencia y replicación. Por lo tanto, *E. chaffeensis* es capaz de cambiar su membrana vacuolar para un desarrollo eficiente. Este proceso tiene como objetivo escapar de la fusión con los lisosomas (Moumène y Meyer 2015).

Ehrlichia spp. ha desarrollado una gran cantidad de factores de virulencia para evadir las defensas innatas del huésped, incluyendo la apoptosis. Las mórulas de *Ehrlichia* spp. interactúan con las mitocondrias produciendo proteínas que inhiben la actividad mitocondrial y posterior apoptosis (Liu *et al.* 2011). Se ha demostrado *in vitro* que la polimerización de la actina del citoesqueleto celular en presencia de calcio y hierro es importante en el proceso de propagación intercelular de *E. canis* (Alves *et al.* 2014).

Los microorganismos presentes en la saliva del artrópodo entran al torrente sanguíneo del huésped y se multiplica en las células sanguíneas hasta formar las mórulas. Después de la desintegración de la mórula se liberan nuevos cuerpos elementales que invaden nuevas células sanguíneas. La infección dentro del animal se disemina vía sanguínea o linfática dentro de las células mononucleares infectadas, llegando a otros sistemas orgánicos como hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos donde se multiplican (Harrus *et al.* 1999, Kelly 2000, Skotarczak 2003, Procajło *et al.* 2011).

De acuerdo con estudios experimentales el curso subsiguiente de la EMC se ha dividido en tres etapas después de un período de incubación de 8 a 20 días: aguda, subclínica y crónica; en los casos en que ocurre la enfermedad en forma natural es difícil asignar con precisión la etapa de la misma (Mylonakis *et al.* 2010b). La mayoría de los perros se recuperan de la fase aguda con tratamiento adecuado pero aquellos perros no tratados se recuperan espontáneamente de la fase aguda después de 2 a 4 semanas y entran en la fase subclínica que puede durar hasta 4 meses en perros infectados experimentalmente y puede persistir hasta 10 años en perros infectados naturalmente. Los perros inmunocompetentes pueden eliminar la infección durante este periodo, pero algunos eventualmente desarrollarán la fase

crónica de la enfermedad caracterizada por una grave aplasia de la médula ósea (mielosupresión), pancitopenia de sangre periférica y alta mortalidad por septicemia y/o hemorragias graves (Kelly 2000, Mylonakis *et al.* 2010b, Straube 2010, Harrus *et al.* 2012).

Se considera que la trombocitopenia es la anomalía hematológica más común y consistente de perros infectados natural o experimentalmente con *E. canis*; ésta ocurre en más del 90% de los perros infectados. La trombocitopenia en la EMC se atribuye a diferentes mecanismos en las diferentes etapas de la enfermedad. En la etapa aguda la trombocitopenia se atribuye a un consumo de plaquetas incrementado debido a procesos inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos (vasculitis), aumento del secuestro esplénico de plaquetas y destrucción inmunológica o lesión que resulta en una disminución de la vida media plaquetaria inmune mediada (Harrus *et al.* 1999, 2012, Harrus 2015). Estudios en los cuales se han utilizado radioisótopos han demostrado que el promedio de vida de las plaquetas disminuye de un promedio de 9 a 4 días a 2 a 4 días después de la infección con *E. canis* (Harrus *et al.* 1999). Además, una citocina sérica, el factor inhibitorio de la migración plaquetaria (FIMP) ha sido aislado y caracterizado de perros con ehrlichiosis y su concentración está inversamente relacionado con el conteo plaquetario. Altas concentraciones de FIMP están asociados a cepas más virulentas de *E. canis*. El FIMP inhibe la migración plaquetaria y es producido por linfocitos expuestos a monocitos infectados. En la fase crónica, se considera como mecanismo de la disminución plaquetaria a la médula ósea hipoplástica (hipocelularidad). La trombocitopenia está acompañada de disfunción plaquetaria (trombocitopatía) en los perros infectados. La disfunción plaquetaria junto con el conteo bajo de plaquetas, contribuye a las hemorragias observadas en la EMC (Harrus *et al.* 1999, 2012).

La demostración en suero de anticuerpos antiplaquetarios (AAP) después de la infección experimental con *E. canis* apoya la hipótesis de que la destrucción inmune también contribuye a la patogénesis de la trombocitopenia de la ehrlichiosis aguda (Harrus *et al.* 1999). Aquellos perros no tratados adecuadamente entran a la fase subclínica y se caracterizan por ser portadores de *E. canis* clínicamente sanos, aunque el conteo de plaquetas puede mantenerse bajo (Harrus *et al.* 2012). En infecciones experimentales indican que el bazo es el órgano más susceptible para albergar *E. canis* durante la fase subclínica. Además, en infecciones naturales la visualización de mórulas

es más probable en aspirados esplénicos que en frotis de capa blanca sanguíneos (Faria *et al.* 2010). Se cree que el bazo juega un papel importante en la patogénesis y en la expresión clínica de la enfermedad. Los perros esplenectomizados experimentalmente infectados con *E. canis* mostraron enfermedad clínica leve en comparación con los perros no esplenectomizados quienes mostraron una enfermedad clínica más severa (Harrus *et al.* 1998). Además de la trombocitopenia se puede presentar anemia normocítica no regenerativa y una ligera leucopenia con monocitosis (Procajlo *et al.* 2011, Waner y Harrus 2013). En un estudio experimental reciente, los perros inoculados con *E. canis* manifestaron cambios significativos en el hematocrito, la hemoglobina y el recuento plaquetario en comparación con el grupo control no infectado (Nair *et al.* 2016).

Entre las anomalías bioquímicas más resaltantes de los perros infectados con *E. canis* se encuentra la hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia, aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina, de la alanina aminotransferasa y aumento en las concentraciones de urea y creatinina. La hipoalbuminemia puede ser consecuencia de la pérdida periférica de albúmina en fluidos inflamatorios edematosos como resultado de un incremento de la permeabilidad vascular, pérdida de sangre o disminución en la producción de proteínas debido a una enfermedad leve del hígado o puede ser debido a cambios mínimos del glomérulo. Como la síntesis de la albúmina está regulada por la presión oncótica, la disminución en la concentración de albúmina puede actuar como un mecanismo compensatorio para el estado hiperglobulinémico y así mantener la presión oncótica y prevenir un aumento de la viscosidad sanguínea. La hipergammaglobulinemia suele ser policlonal pero en algunos perros es monoclonal. El papel de los anticuerpos específicos anti-*E. canis* circulantes para eliminar la infección ehrlichial intracelular es mínima. Altos títulos de anticuerpos anti *E. canis* no proporcionan protección cuando los perros son desafiados con inóculos de *E. canis* (Harrus *et al.* 1999, 2012, Procajlo *et al.* 2011). Los perros con gammapatía monoclonal pueden desarrollar hiperviscosidad sanguínea con signos clínicos asociados y lesiones patológicas, como por ejemplo hemorragia subretiniana y desprendimiento de la retina que puede conducir a ceguera aguda (Harrus *et al.* 2012). Se ha reportado la actividad de la butirilcolinesterasa aumentada en la etapa aguda y puede ser utilizada como un marcador de inflamación (do Carmo *et al.* 2015).

Anticuerpos IgG anti-*E. canis* aparecen en el

día 15 postinfección experimental. La subclase IgG2 está presente en todas las fases de la EMC. Se ha propuesto que el cambio de isotipo IgG2 está asociado a un tipo de respuesta T_{H1} y su correspondiente producción de interferón γ (IFN γ) (Normand *et al.* 2009) y factor de necrosis tumoral (FNT). Por otra parte, IFN γ y FNT ejercen una acción anti-rickettsial a través de la inducción de la síntesis de ácido nítrico. Aparentemente, la inmunidad mediada por células T y la secreción de IFN γ juegan un papel importante en la recuperación de la infección ehrlichial (Harrus *et al.* 2012).

Durante la fase aguda está presente más frecuentemente la linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia y hepatomegalia. La detección molecular de ADN ehrlichial en nódulos linfáticos, bazo, hígado y riñones y la amplia variedad de órganos que muestran evidencia histológica de infiltrado linfocítico, plasmocítico y monocítico apoya el hallazgo de que *E. canis* está ampliamente distribuida por todo el organismo del animal infectado con el potencial de ocasionar una variedad de signos clínicos (Harrus *et al.* 2012, Waner y Harrus 2013).

Los hallazgos histopatológicos de perros infectados con *E. canis*, incluyen hemorragias petequiales y equimóticas en las superficies serosas y mucosas de la cavidad nasal, tracto gastrointestinal, vejiga urinaria y tejido subcutáneo (Harrus *et al.* 2012).

En pulmones, la infección experimental de perros con *E. canis* resultó en una neumonía intersticial durante la fase aguda de la enfermedad. Los septos alveolares se encontraron engrosados por la presencia de infiltrados de células mononucleares y macrófagos. Se encontraron acumulaciones focales de linfocitos y macrófagos dentro y debajo del endotelio de pequeñas a medianas arterias y venas. Estudios de microscopía electrónica de transmisión en perros infectados experimentalmente mostraron células mononucleares pulmonares con mórulas de *E. canis* adherentes a la superficie luminal de células epiteliales de arteriolas o capilares (Simpson 1974). Locatelli *et al.* (2012) reportaron un caso de hipertensión pulmonar asociada a *E. canis* en un perro de raza Yorkshire en Milán, Italia, los resultados indicaron que la posible causa de tal complicación fue una neumonía intersticial asociada a vasculitis y tromboembolismo secundario debida a daño vascular.

En riñones se demostraron cambios patológicos tanto en los elementos tubulares como en los elementos glomerulares de perros inoculados experimentalmente con *E. canis*; en

estos animales se demostró proteinuria transitoria durante la fase aguda. El examen histológico durante esta fase reveló infiltrados linfocíticos y plasmáticos perivulares especialmente en la corteza renal. Los cambios fueron interpretados como glomerulopatía de cambios mínimos atribuibles a la causa de proteinuria transitoria que podría haber contribuido a la hipoalbuminemia observada en la EMC aguda (Codner y Maslin 1992, Codner *et al.* 1992).

La patología hepática asociada a infección experimental con *E. canis* sin manifestaciones clínicas aparentes ha sido documentada como una infiltración portal de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos que resulta en una distorsión pronunciada de la arquitectura hepática; en otros estudios experimentales se ha observado degeneración grasa centrilobulillar perivascular de leve a moderada e infiltración de células mononucleares periportal (de Castro *et al.* 2004). En un reporte se describe el caso de un perro con hepatitis severa asociado a EMC aguda, manifestando anorexia, vómito intermitente y diarrea de 5 días de duración (Mylonakis *et al.* 2010a).

La esplenomegalia es el hallazgo clínico y patológico más prominente tanto en la etapa aguda como en la crónica de la EMC. En la fase aguda la esplenomegalia es no congestiva y es causada por una proliferación difusa de linfocitos y células plasmáticas en la pulpa roja y blanca. Se demostró que el bazo es el principal reservorio de organismos ehrlichiales probablemente debido a la abundancia de macrófagos residentes; algunos estudios sugieren que es el último órgano en contener al microorganismo antes de su eliminación del cuerpo (Harrus y Waner 2011).

La linfadenomegalia es un hallazgo común durante la fase aguda de la enfermedad; el incremento de tamaño en los nódulos linfoides es en parte debido a la actividad hiperplástica tanto de los linfocitos B como T en respuesta al estímulo antigénico ehrlichial. Una característica histológica de la EMC se observa en la arquitectura alterada del tejido linfopoyético con plasmocitosis y una acumulación de células linfoides y plasmáticas perivascular generalizada; las células B bajo estímulos apropiados se diferencian en células plasmáticas secretoras de gamma globulinas. La intensa plasmocitosis durante la EMC es consistente con la hipergammaglobulinemia, un hallazgo común en perros durante la enfermedad aguda (Mylonakis *et al.* 2011).

Los cambios en la médula ósea reflejan de manera estrecha los hallazgos hematológicos en

perros con EMC; en las etapas tempranas de la enfermedad la médula ósea es hiperplásica en parte reflejando la abundancia de células plasmáticas, sin embargo pocas células grasas están presentes. En la médula ósea hay un incremento en el número de megacariocitos durante la fase aguda como respuesta a la trombocitopenia periférica, indicando trombopoyesis activa. En la fase crónica los perros exhiben una marcada disminución de la población de células mieloides y eritroides con presencia de abundantes células plasmáticas y rara presencia de megacariocitos. La aplasia de la médula ósea es un hallazgo típico de la etapa crónica, la cual puede ser el resultado de supresión y/o necrosis de la médula ósea (Mylonakis *et al.* 2010b).

Se ha demostrado plasmocitosis de las meninges con pocos linfocitos en la mayoría de los perros infectados con EMC en la etapa crónica. En la mayoría de los casos crónicos se observaron células mononucleares formando agregados focales mientras que en la fase aguda presentaron acumulaciones de células difusas alrededor de los vasos sanguíneos. Los sitios más frecuentes fueron el tronco cerebral, el mesencéfalo y la corteza cerebral. En algunos casos se observan hemorragias en el cerebro (Hildebrandt *et al.* 1973). Recientemente, se reportó el caso de un perro normotrombocítico con meningoencefalitis diagnosticado con *E. canis* por PCR en fluido cerebroespinal (Kaewmongkol *et al.* 2016).

Se ha observado patología oftálmica en la mayoría de los perros infectados natural y experimentalmente con *E. canis*. El cambio patológico más marcado observado en el ojo fue el relacionado con la presencia de células plasmáticas alrededor de las venas en la capa celular ganglionar. Se considera que la uveítis bilateral anterior y lesiones retinales son los hallazgos clínicos más frecuente entre perros naturalmente infectados (Massa *et al.* 2002, Komnenou *et al.* 2007, Oriá *et al.* 2008). Leiva *et al.* (2005) en un estudio conducido con perros naturalmente infectados con *E. canis* en Barcelona, España, encontraron que los animales también presentaban además de uveítis, daño retinal exudativo y hemorragia retinal. En un estudio realizado con 14 perros infectados experimentalmente con *E. canis* se observó que todos desarrollaron lesiones oculares en la fase aguda y subclínica (Pancieria *et al.* 2001). En el reporte de un caso se describe la detección directa de *E. canis* de la conjuntiva de un perro por PCR; el animal presentó blefaroespasma bilateral, fotofobia y uveítis bilateral anterior (Walser-Reinhard *et al.* 2012).

Hildebrandt *et al.* (1973) detectaron

hemorragias macro y microscópicas en el corazón. Además, observaron agregados de células mononucleares en las proximidades de los vasos sanguíneos miocárdicos y en el tejido graso pericárdico. Diniz *et al.* (2008) sugieren un aumento en el riesgo de infarto en perros infectados con *E. canis* en la etapa aguda. En tal investigación se evaluaron el electrocardiograma, ecocardiograma, presión arterial y troponina cardíaca sérica; los perros infectados con *E. canis* tuvieron la troponina cardíaca sérica más alta que el grupo control no infectado. Los autores concluyen que la infección aguda con *E. canis* puede ser un factor de riesgo de lesión miocárdica en perros infectados naturalmente, por otra parte, Koutinas *et al.* (2012) indicaron que la elevación en la troponina cardíaca no mostró diferencias significativas entre perros con ehrlichiosis canina mielosupresiva y no mielosupresiva, presentando ambos grupos riesgos cardíacos similares, lo cual indica que el riesgo cardíaco puede estar presente tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad, encontraron además que la concentración de troponina no es un buen predictor del resultado final de la enfermedad.

Manifestaciones clínicas

La EMC es un desorden multisistémico (Harrus y Waner 2011, Harrus *et al.* 2012, Waner y Harrus 2013). La infección producida por *E. canis* está asociada a una amplia variedad de manifestaciones clínicas que van a depender de varios factores, entre ellos dosis del patógeno transmitido durante la alimentación de la garrapata, actividad del sistema inmunológico del perro, virulencia de la cepa de *Ehrlichia*, raza del perro y coinfección con otros patógenos; por lo tanto, se pueden observar desde casos sin signos clínicos (asintomáticos), otros con malestar leve, llegando a casos graves y algunas veces fatales (Price y Sayer 1983, Little 2010). Variaciones en la virulencia de las cepas de *E. canis* puede influir en la severidad de la EMC, por lo que la determinación de la diversidad genética en cada región es importante para relacionarla con el grado de severidad de la enfermedad (Mylonakis *et al.* 2010b, Aguiar *et al.* 2013, Ferreira *et al.* 2014). *E. canis* puede infectar todas las razas de perros, pero los de la raza Pastor Alemán parecen ser los más susceptibles al presentar la forma más severa de la enfermedad, con una alta morbilidad y mortalidad comparados con otras razas (Harrus *et al.* 1997b, Mylonakis *et al.* 2004, Straube 2010). Las coinfecciones (infecciones con varios microorganismos al mismo tiempo) pueden potenciar la patogénesis de la enfermedad alterando y exacerbando las manifestaciones clínicas. Las coinfecciones complican el diagnóstico, el tratamiento y puede influir

negativamente en el pronóstico, si el médico veterinario no sospecha, documenta y trata cada infección concurrente (Kordick *et al.* 1999, Breitschwerdt *et al.* 2005, Gaunt *et al.* 2010, Little 2010, de Caprariis *et al.* 2011, De Tommasi *et al.* 2013).

En la etapa aguda los signos clínicos son inespecíficos, siendo los más frecuentes la anorexia, depresión, letargia, ligera pérdida de peso, fiebre, debilidad general y apatía. Se presentan síntomas del sistema respiratorio como la disnea, secreciones seropurulentas de las fosas nasales y sacos conjuntivales e incluso neumonía intersticial. También hay linfadenomegalia, esplenomegalia y tendencia a sangrar. La tendencia a sangrar se manifiesta por la presencia de petequias dérmicas, equimosis o ambas. Se han descrito trastornos neurológicos como la ataxia, tembor de la cabeza y síntomas convulsivos. En perros con ehrlichiosis aguda se ha descrito epistaxis uni o bilateral, extravasculaciones en los sitios de inyección, extravasculación en la cámara anterior de los ojos, sangre en la orina y heces (Kelly 2000, Skotarczak 2003, Harrus y Waner 2011, Little 2010, Procajlo *et al.* 2011, Harrus *et al.* 2012).

Los signos de la fase aguda usualmente disminuyen espontáneamente dentro de una a cuatro semanas pero los perros no tratados pueden permanecer en la etapa subclínica. Los perros inmunocompetentes son capaces de eliminar al agente infeccioso durante la fase subclínica, la cual puede durar de meses a años, donde no hay signos clínicos (Oriá *et al.* 2004). Los perros que son incapaces de eliminar el agente infeccioso desarrollan una infección persistente subclínica y se convierten en portadores asintomáticos; tales perros manifiestan una trombocitopenia leve (Little 2010, Straube 2010). Codner y Farris-Smith (1986) caracterizaron la fase subclínica en una perrera de Missisipi y encontraron una prevalencia del 53% de perros en esta fase. La mayoría tenían títulos altos (1/5.120) de anticuerpos anti-*E. canis*, hiperglobulinemia y trombocitopenia; la hemoglobina, la albúmina en suero y orina y tiempos de sangría estaban dentro de los valores normales. En otro estudio Waner *et al.* (1997), caracterizaron la fase subclínica en perros beagle inoculados experimentalmente con *E. canis*, demostrando que los perros tenían títulos altos de anticuerpos anti-*E. canis* (títulos ente 1/2.560 a 1/20.480) y una trombocitopenia leve.

Algunos perros progresan a la fase crónica, la cual puede ser leve o severa. Esta etapa se caracteriza por presentar signos clínicos recurrentes y anormalidades hematológicas como la pancitopenia. En algunos perros puede

desarrollarse una fase crónica grave caracterizada por pérdida de peso y emaciación, fiebre o hipotermia, palidez y edema periférico en particular de las patas traseras y escroto. La diátesis hemorrágica es más común en la fase crónica y se manifiesta por sangramiento superficial tales como petequias y equimosis cutáneo y de las mucosas, epistaxis, hematuria, melena y sangrado prolongado en el sitio de la venopunción debido a una alteración de la hemostasia primaria. Los signos oculares pueden estar presentes en todas las fases de la EMC; la trombocitopenia severa de la etapa crónica causa hemorragias retinales, hifema y petequias conjuntivales. Se ha reportado ataxia, convulsiones e inclinación de la cabeza en una minoría de perros con signos clínicos. La muerte usualmente se debe a hemorragias extensas o a infecciones bacterianas secundarias (Kelly 2000, Oriá *et al.* 2004, Little 2010, Mylonakis *et al.* 2010b, Straube 2010).

Ehrlichia ewingii

Ehrlichia ewingii es el agente etiológico de la ehrlichiosis granulocítica canina (EGC), transmitida por la garrapata estrella solitaria *Amblyomma americanum* (Anderson *et al.* 1992). *E. ewingii* está distribuida en Estados Unidos (regiones del sureste y surcentral), África (Camerún) y América del Sur (Brasil) (Ndip *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2009, Cohn y Breitschwerdt 2012, Harrus *et al.* 2012). El venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es el principal hospedador de *A. americanum* por lo que es considerado el principal reservorio de *E. ewingii* (Cohn y Breitschwerdt 2012, Harrus *et al.* 2012, Starkey *et al.* 2015).

En 1999 se detectó en cuatro personas por PCR *E. ewingii* y se observaron mórulas en granulocitos en dos de estos cuatro pacientes. Todos habían estado expuestos a garrapatas y presentaron fiebre, dolor de cabeza, trombocitopenia con o sin leucopenia. Tres de estos pacientes estaban recibiendo terapia inmunosupresora y los cuatro fueron tratados exitosamente con doxiciclina (Buller *et al.* 1999). A diferencia de otros agentes ehrlichiales, *E. ewingii* no ha podido ser cultivada *in vitro* y la detección de infección se ha basado en métodos serológicos o moleculares, aunque se ha reportado reacciones cruzadas en los métodos serológicos, por lo que se puede utilizar tanto antígeno de *E. canis* como de *E. chaffeensis* para el diagnóstico de *E. ewingii*, por lo que los métodos moleculares son los más seguros para identificar la especie (Little *et al.* 2010, Cocayne y Cohn 2012).

Patogenia y manifestaciones clínicas

Después de la picadura de las garrapatas infectadas, *E. ewingii* invade los granulocitos formando colonias de microorganismos dentro de las vacuolas llamadas mórulas. El tiempo requerido desde la picadura de la garrapata hasta la transmisión del patógeno es desconocido (Cocayne y Cohn 2012, Cohn y Breitschwerdt 2012). Una vez que los neutrófilos son liberados de la médula ósea, su vida media en circulación es de 6 a 8 horas. Sin embargo, estas células de vida corta son el sitio predilecto de replicación de *E. ewingii* (Cocayne y Cohn 2012). Está demostrado que la infección *in vivo* de la bacteria intracelular obligatoria *E. ewingii* retrasa la apoptosis espontánea de los neutrófilos caninos al estabilizar la integridad mitocondrial y esto trae como consecuencia que la bacteria sobreviva más tiempo en su célula hospedadora; en este estudio se demostró que los neutrófilos caninos pueden sobrevivir en cultivo celular hasta 5 días y que *E. ewingii* puede continuar replicando en los neutrófilos. La alteración de la apoptosis de los neutrófilos tiene profundos efectos sobre la respuesta inflamatoria y la resolución de la infección. Este proceso de retraso de la apoptosis de los neutrófilos por parte de *E. ewingii* puede ser un importante mecanismo patológico que prolonga la infección y la inflamación en el hospedador mamífero. La eliminación de la infección en perros infectados experimentalmente resultó en la normalización de la supervivencia de los neutrófilos (Xiong *et al.* 2008).

Las mórulas de *E. ewingii* se pueden observar dentro de los granulocitos 12 días después de la inoculación experimental y los signos clínicos se observan entre los 18 a 28 días postinfección, aunque hay investigaciones que han observado los signos clínicos entre los 7 a 14 días (Cocayne y Cohn 2012, Cohn y Breitschwerdt 2012). La inmunosupresión puede exacerbar o potenciar las manifestaciones clínicas; las infecciones experimentales han tenido más éxito en perros tratados con ciclofosfamida o glucocorticoides (agentes inmunosupresores). Sin embargo, en perros naturalmente infectados, la infección ocurre sin aparente estado inmunosupresor (Cocayne y Cohn 2012). En algunas infecciones experimentales los perros se mantienen asintomáticos o desarrollan una enfermedad breve y autolimitante (Yabsley *et al.* 2011). La patogénesis de la EGC ha sido poco estudiada debido a que *E. ewingii* no se ha podido cultivar *in vitro*. Un componente inmune mediado puede ser el responsable de la poliartritis y de la destrucción de plaquetas (Cocayne y Cohn 2012).

Las manifestaciones clínicas de la infección por *E. ewingii* en perros incluyen fiebre, trombocitopenia, manifestaciones nerviosas (inclinación de la cabeza, temblores y anisocoria), laxitud, debilidad, síntomas musculoesqueléticos (cojera, dificultad para estar de pie o caminar) y poliartritis neutrofílica (Goldman *et al.* 1998, Little 2010, Cocayne y Cohn 2012, Cohn y Breitschwerdt 2012, Allison y Little 2013), este último signo aparece en perros infectados de forma crónica (Murphy *et al.* 1998). Yabsley *et al.* (2011) infectaron perros experimentalmente con *E. ewingii* utilizando a *Amblyomma americanum* como vector, no logrando infectarlos con *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis*, los animales desarrollaron pirexia, trombocitopenia y leucopenia, sin llegar a desarrollar poliartritis ni laxitud, encontrando además que los signos clínicos fueron más leves en perros re infectados. Starkey *et al.* (2015) señalan que la infección con *E. ewingii* puede permanecer en el perro largo tiempo en presencia de coinfección con otras especies del género *Ehrlichia*, sin embargo, la persistencia en el caso de infección solo con *E. ewingii* es variable, pudiendo permanecer poco o mucho tiempo en el animal. Se reportó el caso de un cachorro mestizo Pastor Alemán de ocho semanas proveniente de Ohio, Estados Unidos, con letargo progresivo y cojera. En el examen físico se identificó fiebre y derrame en múltiples articulaciones. La hematología reveló anemia, neutrofilia y monocitosis. Se detectaron mórulas en neutrófilos de extendidos sanguíneos y líquido articular y al realizar la PCR para *E. ewingii* resultó positivo en ambas muestras. Los síntomas desaparecieron poco después del tratamiento con doxiciclina y la PCR resultó negativa a los 18 días y 3 años después (Gieg *et al.* 2009).

Ehrlichia chaffeensis

Ehrlichia chaffeensis conocida como el agente causal de la ehrlichiosis monocítica humana, una zoonosis humana emergente, transmitida por la garrapata estrella solitaria *A. americanum*, siendo el venado de cola blanca (*O. virginianus*) el reservorio primario, ya que desarrolla una infección persistente por *E. chaffeensis* sin mostrar signos clínicos de la enfermedad; también los coyotes (*Canis latrans*) pueden servir como reservorio debido a que suelen infectarse naturalmente. Los humanos y los perros son considerados hospedadores incidentales (Kocan *et al.* 2000, Davidson *et al.* 2001, Paddock y Childs 2003, Little 2010, Nair *et al.* 2014). Se ha logrado identificar por PCR en perros de Estados Unidos (sureste de Virginia, Oklahoma y Carolina del Norte), Asia (Corea del Sur) y Sur América (Venezuela) (Gutiérrez *et al.* 2008, Yu *et al.* 2008,

Harrus *et al.* 2012). Poco se ha estudiado con relación a la patogenia, patología y manifestaciones clínicas, sin embargo hay trabajos aislados en los que se exploran estos aspectos.

Los perros son susceptibles a la infección con *E. chaffeensis*, tal como lo demuestra un estudio en el que inocularon experimentalmente a cuatro cachorros con cultivo de *E. canis* y cuatro cachorros con cultivo de *E. chaffeensis*. Los perros inoculados con *E. canis* desarrollaron un cuadro febril leve, trombocitopenia y secreción ocular leve en uno de los perros, mientras que los perros inoculados con *E. chaffeensis* presentaron una respuesta febril leve sin otro signo clínico. Uno de los perros inoculado con *E. chaffeensis* fue re infectado con sangre infectada con *E. canis* mostrando fiebre, anorexia y trombocitopenia, demostrándose falta de protección contra *E. canis* por inoculación previa con *E. chaffeensis* (Dawson y Ewing 1992).

En otra investigación se evidenció por PCR *E. chaffeensis* en perros del sureste de Virginia (Estados Unidos). Se analizaron 38 muestras de perros de cinco refugios y una perrera. De los 38 perros, 8 (42%) fueron PCR positivo a *E. chaffeensis* y 6 (32%) fueron PCR positivo a *E. ewingii* y ninguno positivo a *E. canis*. Los investigadores concluyen que el perro constituye un reservorio potencial para *E. chaffeensis* (Dawson *et al.* 1996). En este trabajo no se trata lo relacionado a las manifestaciones clínicas.

Breitschwerdt *et al.* (1998) demostraron en tres perros infección natural con *E. chaffeensis*. Estos perros presentaron signos clínicos de ehrlichiosis canina: uveítis anterior, vómito, epistaxis y linfadenomegalia.

Zhang *et al.* (2003) infectaron experimentalmente dos perros Beagle con *E. chaffeensis* cepa Arkansas y observaron durante 6 meses después de la inoculación los signos clínicos, cambios hematológicos, anticuerpos anti-*E. chaffeensis* y presencia de *E. chaffeensis* en sangre. Durante los 6 meses los perros no manifestaron fiebre ni perdieron peso. Dentro de los parámetros hematológicos lo más relevante fue la presencia de trombocitopenia, la cual apareció dos semanas después de la inoculación y se mantuvo durante todo el estudio. En uno de los perros se demostró por PCR *E. chaffeensis* hasta los 4 meses mientras que en el otro animal se demostró por 81 días. Con respecto a los títulos de anticuerpos anti-*E. chaffeensis*, en ambos perros aparecieron a las 4 semanas postinoculación (día 23) a un título 1:64; luego aumentaron alcanzando en la semana séptima y octava un título 1:16.384.

Durante el resto del estudio los títulos se mantuvieron altos. Los resultados de esta investigación demuestran que los perros pueden mantenerse como transportadores de *E. chaffeensis* durante 3 a 4 meses sin presentar signos clínicos. Los investigadores concluyeron que se puede considerar a los perros como portadores de *E. chaffeensis*.

En otro estudio se infectó un grupo de tres perros con *E. chaffeensis*. Los animales fueron vigilados durante 42 días (6 semanas) y se evaluaron los signos clínicos, diferencias hematológicas y patológicas. *E. chaffeensis* causó infección persistente en los tres perros infectados, detectable durante las 6 semanas. Los perros infectados con *E. chaffeensis* mantuvieron normal el apetito y la actividad física. El único signo clínico importante fue presencia de fiebre durante varios días postinfección y comenzó en el día 9. En las 6 semanas no se apreciaron cambios hematológicos. Durante todo el estudio se detectó ADN de *E. chaffeensis* en sangre por PCR. ADN de *E. chaffeensis* se evidenció en hígado, bazo, nódulo linfático cervical y pulmón. No se observó hepatomegalia ni esplenomegalia. La inflamación en pulmón se caracterizó por ser de escaso a moderado el número de macrófagos y linfocitos perivascuales. Uno de los perros infectado con *E. chaffeensis* exhibió lesión hepática con un infiltrado leve periportal de macrófagos y linfocitos y microgranulomas sinusoidales. Hiperplasia linfoide de leve a moderada se observó en el bazo del grupo de perros infectados con *E. chaffeensis*. Los investigadores justifican los pocos signos clínicos a la vía de inoculación que es intravenosa, cuando lo ideal sería vía picadura de garrapata, ya que su saliva contiene potentes factores antiinflamatorios, inmune moduladores y antihepatostáticos y esto crea un ambiente que protege al patógeno de las defensas del huésped. Además, otro factor importante es la virulencia de la cepa utilizada (Nair *et al.* 2016).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la ehrlichiosis canina se basa en una combinación de datos clínicos epidemiológicos, anomalías hematológicas, detección directa de la bacteria y hallazgos serológicos. La infección de los perros con bacterias del género *Ehrlichia* resulta en un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde infección inaparente y subclínica a enfermedad severa y potencialmente fatal (Cohn 2003, Harrus y Waner 2011, Harrus *et al.* 2012, Allison y Little 2013). Cuando la infección se convierte en enfermedad aparecen las anomalías hematológicas como la trombocitopenia, la cual suele ser de moderada a

severa en la etapa aguda en la EMC, acompañada de anemia leve y leucopenia. Durante la etapa subclínica se puede presentar trombocitopenia leve en ausencia de signos clínicos. En la fase crónica la trombocitopenia suele ser severa acompañada de una anemia marcada y leucopenia (Harrus y Waner 2011). Se deben tomar en cuenta los datos epidemiológicos como por ejemplo lugar de procedencia (si es un área endémica), historial de viajes e infestación por garrapatas (Harrus *et al.* 2012).

Visualización microscópica

Debido a que *E. canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis* infectan células hematopoyéticas es posible observarlas microscópicamente en una variedad de muestras clínicas que incluyen sangre periférica, médula ósea, aspirados de tejidos y líquidos biológicos, tales como líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial (Allison y Little 2013, Allen *et al.* 2014, Kaewmongkol *et al.* 2016). Estas tres especies es frecuente encontrarlas en sangre periférica. Aunque la bacteria individual tiene generalmente menos de 0,5 μm de diámetro, estas bacterias se multiplican por fisión binaria dentro de la vacuola citoplasmática hasta formar una microcolonia o mórula, la cual se puede observar con coloraciones tipo Romanowski (Diff-Quik o Hemacolor) como una inclusión granular basófila en el citoplasma de monocitos y linfocitos, en el caso de *E. canis* o *E. chaffeensis* y en neutrófilos en el caso de *E. ewingii*, midiendo entre 4-6 μm de diámetro (Allison y Little 2013).

Frotis de capa blanca

Un método muy utilizado lo constituye el frotis de capa blanca (FCB), el cual se realiza centrifugando una muestra de sangre con EDTA en un capilar para microhematocrito o en un tubo Wintrobe. A través de este método se concentran los leucocitos y las plaquetas; con este concentrado se realiza un frotis y se colorea. A pesar de que es un método de fácil ejecución y económico requiere de personal muy entrenado en el reconocimiento de las inclusiones. Las mórulas de *E. canis* o *E. chaffeensis* se consiguen en el citoplasma de monocitos y linfocitos mientras que las mórulas de *E. ewingii* se encuentran en el citoplasma de granulocitos. Desafortunadamente, la búsqueda de las inclusiones en monocitos y linfocitos es dificultosa y consume tiempo. La búsqueda de las inclusiones se hace con aceite de inmersión con objetivo de 1000X en 1000 campos. El tiempo empleado por este método se calcula entre 50 a 60 minutos. Debido a que *E. ewingii* se encuentra en granulocitos y estos son más abundantes la búsqueda es más fácil. El FCB

se recomienda para la etapa aguda de la infección durante las primeras semanas de infección (Mylonakis *et al.* 2003, Allison y Little 2013). Fagocitosis de plaquetas, gránulos azurófilos en linfocitos y fagocitosis de material nuclear puede confundir el diagnóstico con inclusiones de ehrlichias (Harrus y Waner 2011).

Métodos moleculares

Los métodos de diagnóstico molecular basado en la detección de secuencias de ácidos nucleicos característicos por PCR se utilizan para confirmar la infección activa con *Ehrlichia* spp. (Allison y Little 2013). Se ha demostrado que la PCR es un método sensible, frecuentemente para la etapa aguda de infección en perros y detecta ADN de *Ehrlichia* spp. antes de que ocurra la seroconversión por anticuerpos (Harrus *et al.* 2012). Varios ensayos se basan en diferentes genes diana, por ejemplo, *16S ARNr*, *p28*, *p30*, *dsb*; sin embargo los ensayos de PCR basados en los genes *16S ARNr* y *p30* son los más comúnmente utilizados (Harrus y Waner 2011). Se considera que la PCR realizada en muestras de bazo es más sensible para la evaluación de la eliminación de *E. canis* cuando se compara con muestras de sangre o de médula ósea (Harrus *et al.* 2004). Una desventaja de la PCR es su facilidad de contaminación, lo cual resulta en falsos positivos. Para asegurar que no ocurra la contaminación se recomienda el uso de controles en cada paso de la PCR incluyendo la extracción del ADN de la muestra (Allison y Little 2013). Generalmente hay una buena correlación entre los resultados de la PCR y los resultados obtenidos a partir del aislamiento en cultivo celular (Kelly 2000). En la PCR de un solo paso se ha utilizado cebadores que permiten la amplificación de todas las especies de *Ehrlichia* provenientes de muestras de sangre y tejidos (Iqbal *et al.* 1994). Las PCRs anidadas mejoran la especificidad y sensibilidad del ensayo de PCR para *Ehrlichia* spp. (Dawson *et al.* 1996, Breitschwerdt *et al.* 1998, Murphy *et al.* 1998). En la PCR anidada cebadores género específicos se utilizan en la primera reacción para detectar ADN ehrlichial, mientras que los cebadores especie específicos se utilizan en la segunda reacción para diferenciar entre las distintas especies (Kelly 2000).

La PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) es más sensible y menos propensa a la contaminación que la PCR convencional y permite la cuantificación de la carga bacteriana. Esta modalidad de PCR se ha utilizado para la cuantificación de la carga bacteriana en perros natural y experimentalmente infectados por *E. canis* (Baneth *et al.* 2009). La capacidad de los instrumentos de la PCR en tiempo real ha

permitido el diseño de ensayos multiplex para la detección simultánea de varios patógenos en una muestra. Un multiplex qPCR ha sido diseñado para detectar simultáneamente *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *E. canis* (Doyle *et al.* 2005). En otro estudio se logró la evidencia simultánea por qPCR de *Anaplasma phagocytophilum*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* (Bell y Patel 2005).

Cultivo

Este método resulta ser muy costoso y poco útil para ser utilizado en la práctica clínica. Por otro lado, el aislamiento se logra después de las 8 semanas, por lo tanto este procedimiento se utiliza con fines de investigación. *E. canis* y *E. chaffeensis* se han logrado aislar en la línea celular continua DH82. Hasta los momentos el aislamiento en cultivo celular no ha sido posible para *E. ewingii* (Harrus *et al.* 2012).

Serología

Las técnicas serológicas incluyendo la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) han sido por mucho tiempo un pilar para confirmar la sospecha clínica de enfermedad por *Ehrlichia* spp. La prueba de IFI IgG anti-*E. canis* es la prueba de oro, la cual indica exposición a *E. canis*. La IgM no es considerada un indicador fiable de exposición a *E. canis* debido al desarrollo inconsistente de anticuerpos IgM durante el curso de la enfermedad. Por el contrario, títulos de IgG anti-*E. canis* iguales o mayores a 1/40 son considerados positivos para la exposición a *E. canis*. Para las infecciones agudas se recomienda realizar dos pruebas de IFI consecutivas con una diferencia de 7 a 14 días y un aumento de cuatro veces en la segunda prueba con respecto a la primera se considera infección activa. Los anticuerpos IgG persisten por meses o años después del tratamiento y de la eliminación de la bacteria (Harrus y Waner 2011, Harrus *et al.* 2012, Allison y Little 2013). La desventaja de la prueba IFI es que los anticuerpos detectados contra *E. canis* no son específicos de la bacteria. Se ha descrito reacciones cruzadas en esta prueba serológica entre *E. canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*, por lo tanto no es posible utilizar los resultados de la IFI para distinguir entre infecciones entre estas tres especies (Kelly 2000).

Se ha descrito un número variable de ensayos basados en ELISA pero el que actualmente se está utilizando en la práctica clínica es la prueba SNAP® 3DX® (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA), la cual detecta anticuerpos a *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi* y *E. canis*, mientras que hay otra

prueba SNAP® 4DX® PLUS (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) que detecta anticuerpos a *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Borrelia burgdorferi*, *E. canis* y *E. ewingii*. Es importante señalar que en estas pruebas los anticuerpos reconocen péptidos recombinantes de cada uno de los patógenos lo que les proporciona una alta especificidad (Breitschwerdt y Cohn 2012, Allison y Little 2013).

TRANSMISIÓN

La transmisión de *Ehrlichia* spp. ha sido atribuida a garrapatas, artrópodos hematófagos que pertenecen a la familia Ixodidae de la clase Arachnida. Los perros sirven como reservorios de *E. canis* y anfitriones de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae), el vector primario de esta especie de ehrlichia, *R. sanguineus* es la especie de garrapata más ampliamente distribuida y su presencia ha sido reportada en áreas tropicales y subtropicales, entre los 50°N y 35°S y en el continente americano, su distribución va desde Canadá hasta Argentina (Dantas-Torres 2008). De acuerdo con Ramírez-Barrios *et al.* (2008) *R. sanguineus* es la garrapata que más comúnmente parasita a perros de zonas urbanas en Venezuela. Aunque el principal anfitrión de *R. sanguineus* es el perro doméstico; no obstante, cuando los niveles de infestación son elevados y en ambientes muy parasitados esta especie de garrapata puede parasitar otras especies animales tales como gatos, roedores, aves y hasta humanos (Estrada-Peña y Jongejan 1999, Dantas-Torres *et al.* 2006).

Muchos ixódidos son exófilos; sin embargo *R. sanguineus* está bien adaptada al ambiente intradomiciliario. Se ha observado que el nivel de infestación es elevado en perros que permanecen mucho tiempo en el interior de casas o apartamentos y en aquellos que están confinados en refugios y bioterios (García *et al.* 2007). En áreas tropicales y subtropicales la prevalencia de *R. sanguineus* es alta durante todo el año mientras que en áreas de clima templado son abundantes al final de la primavera y hasta principios del otoño; existen evidencias que sugieren que las bajas temperaturas afectan negativamente el desarrollo de esta especie de garrapata (Inokuma *et al.* 1996).

El modo de transmisión de *E. canis* es transtadial pero no trasovarial (Groves *et al.* 1975), por lo cual la infección es transmitida subsecuentemente de larvas a ninfas y de ninfas a adultos, pero no de las hembras a los huevos de una nueva generación. La infección de *R. sanguineus* con *E. canis* ocurre durante el estadio de larva o ninfa cuando éstas ingieren sangre de un perro bacteriémico. En el interior de la

garrapata los microorganismos ingeridos se multiplican en células del intestino medio y posteriormente en sus glándulas salivales (Aguiar *et al.* 2007), las garrapatas infectadas inoculan la bacteria a un nuevo hospedador en la próxima ingesta sanguínea. Además de la transmisión transtadial se ha descrito que la transmisión también puede ser intraestadial, al menos en condiciones experimentales; en este sentido, Bremer *et al.* (2005) demostraron que los machos adultos pueden tomar múltiples comidas sanguíneas y adquirir y transmitir *E. canis* a animales susceptibles.

Gracias a las diferencias morfológicas, biológicas y moleculares encontradas en las garrapatas clasificadas como *R. sanguineus* procedentes de diferentes regiones geográficas, se ha llegado a la conclusión de que esta especie de ixódido es en realidad un complejo formado por al menos 10 especies estrechamente relacionadas (Danta-Torres 2008). Para Latinoamérica se considera que el taxón *R. sanguineus* incluye al menos dos especies o linajes diferentes: “templado” y “tropical” (Moraes-Filho *et al.* 2011); la primera restringida a Argentina, Chile y al sur del Brasil mientras que la última se distribuye desde México hasta Brasil. Los miembros del complejo *R. sanguineus* pueden poseer diferencias en su competencia vectorial. Los estudios publicados a la fecha muestran que las garrapatas pertenecientes al linaje o especie “tropical” son más susceptibles a la infección por *E. canis* y son más competentes en su transmisión que aquellas pertenecientes al linaje “templado” (Cicuttin *et al.* 2015, Moraes-Filho *et al.* 2015).

Aunque *R. sanguineus* es el vector más comúnmente asociado con la transmisión de *E. canis*, la infección ha sido transmitida experimentalmente por *Dermacentor variabilis* Say, 1821 (Johnson *et al.* 1998), la cual ha sido encontrada parasitando perros en Venezuela (Ramírez-Barrios *et al.* 2008). Además, el ADN de *E. canis* ha sido detectado en pulgas (Insecta: Siphonaptera) pertenecientes a las especies *Xenopsylla cheopis* y *Cediopsylla inaequalis* de zorros (*Vulpes vulpes*) en áreas rurales ubicadas al sur de Italia (Torina *et al.* 2013). El papel de los zorros como reservorios de *E. canis* ha sido señalado anteriormente (Fishman *et al.* 2004, Ebani *et al.* 2011); sin embargo, evidencias moleculares han demostrado la presencia de *E. canis* en pequeños mamíferos de Korea (Kim *et al.* 2006). Estos datos sugieren que existe otro ciclo de transmisión de *E. canis* que involucra artrópodos diferentes a las garrapatas (particularmente a *R. sanguineus*) y pequeños mamíferos que no pertenecen a la familia Canidae como reservorios; es imprescindible pues

investigar la participación de las pulgas y de los pequeños mamíferos en la transmisión de *E. canis* y su importancia médica y veterinaria.

Por otra parte, la transmisión de *E. chaffeensis* y *E. ewingii* se mantiene en la naturaleza en un ciclo que involucra al venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y a la garrapata estrella solitaria, *Amblyomma americanum* (Linnaeus 1758) (Varela-Stokes 2007), una especie de garrapata de tres anfitriones, presente al este de los Estados Unidos que ocupa áreas boscosas en las que existen las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para su desarrollo. Es una especie ecléctica en sus preferencias alimentarias, pues aunque los venados de cola blanca parecen ser sus anfitriones preferidos, diversos mamíferos y aves puede servir como fuente de comida sanguínea para esta especie de garrapata entre los que se mencionan coyotes, zorros, mapaches, zarigüellas, roedores y aves (Childs y Paddock 2003).

Los perros adquieren la infección cuando las ninfas y/o adultos de *A. americanum* infectados se alimentan sobre él (Little 2010), diferentes estudios han demostrado la infección experimental y natural de perros con *E. chaffeensis* (Dawson y Ewing 1992, Murphy *et al.* 1998) gracias a esta especie de ixódido. Además de los venados y los perros, el ADN de *E. chaffeensis* y/o anticuerpos específicos contra esta rickettsia han sido detectados en mapaches (*Procyon lotor*), zarigüeyas (*Didelphis virginianus*) (Lockhart *et al.* 1997), coyotes (*Canis latrans*) (Kocan *et al.* 2000) y ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) (Magnarelli *et al.* 1997, Sosa-Gutiérrez *et al.* 2014) lo que sugiere que estas especies animales pudieran servir como reservorio de estas bacterias. Aunque el mecanismo exacto por medio del cual la bacteria es transmitida desde la garrapata a los anfitriones vertebrados es desconocido, se considera que la transmisión de *E. chaffeensis* por *A. americanum* es transtadial (Ewing *et al.* 1995) y no transovarial (Long *et al.* 2003).

Además de *A. americanum*, el ADN de *E. chaffeensis* ha sido detectado en *Dermacentor variabilis* (Roland *et al.* 1998, Steiert y Gilfoy 2002), *A. cajennense*, *A. maculatum* (Williamson *et al.* 2010), *A. parvum* (Tomassone *et al.* 2008), *Ixodes pacificus* (Kramer *et al.* 1999, Holden *et al.* 2003), *I. ricinus* (Parola y Raoult 2001), *Haemaphysalis yeni* (Cao *et al.* 2000) y *R. sanguineus* (Ndip *et al.* 2007); aunque el hallazgo de ADN de una especie particular de *Ehrlichia* en una determinada especie de garrapata no es suficiente para incriminarla como vector, sugiere su posible participación en el ciclo de transmisión

E. chaffeensis, el cual debe ser adecuadamente investigado.

Aunque, el único reporte de *A. americanum* en Venezuela data de 1919 (Guerrero 1996); recientemente, se ha reportado la presencia de otras garrapatas del género *Amblyomma* como ectoparásitos de perros entre ellas *A. maculatum* y *A. parvum* (Guerrero 1996, Manzanilla *et al.* 2002, Forlano *et al.* 2008, Forlano y Meléndez. 2013) y aunque la infección por *E. chaffeensis* y/o *E. ewingii* no se ha investigado en estas garrapatas, es probable que participen en la transmisión de *Ehrlichia* spp. en nuestro país.

Además de *A. americanum*, *E. ewingii* ha sido detectada en *D. variabilis* y *R. sanguineus* (Murphy *et al.* 1998, Steiert y Gilfoy 2002) lo que permitiría explicar la presencia de casos de infección por esta bacteria en lugares fuera del rango de distribución de *A. americanum*. Los datos acumulados sugieren que los reservorios de *E. ewingii* son perros, ciervos, mapaches, zarigüeyas y en ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*).

Además de la transmisión por garrapatas y posiblemente otros artrópodos, las transfusiones sanguíneas y accidentes con objetos punzo cortantes contaminados con sangre infectada son consideradas formas potenciales de transmisión de *Ehrlichia* spp. ya que los organismos pueden mantenerse viables por meses en sangre total refrigerada (Regan *et al.* 2013).

Los cambios ambientales producto del calentamiento mundial, la explosión demográfica de la población humana, el transporte de mascotas de una región a otra, la deforestación y la penetración humana en los nichos ecológicos donde circulan las ehrlichias por motivos laborales y recreacionales, son algunos de los factores que modifican la dinámica de la transmisión de las enfermedades causadas por estas bacterias, es entonces imprescindible el conocimiento detallado de los diferentes aspectos que intervienen en su transmisión a fin de implementar las medidas más adecuadas para su control.

TRATAMIENTO

Varios fármacos, incluyendo las tetraciclinas (clortetracina, oxitetracilina, minociclina y doxiciclina), macrólidos (azitromicina), fluoroquinolonas (enrofloxacin), cloranfenicol, rifampicina y dipropionato de imidocarb han sido utilizados como agentes quimioterapéuticos contra *E. canis*. Con la excepción de las tetraciclinas y el cloranfenicol, los demás agentes

han dado resultados desfavorables. Debido a los efectos secundarios nocivos del cloranfenicol, el uso de este fármaco en la EMC ha disminuido y se reserva para los casos particulares cuando no se pueden utilizar las tetraciclinas (Harrus 2015). De las tetraciclinas, la doxiciclina es considerada el antibiótico de elección para las infecciones rickettsiales. Para la ehrlichiosis el consenso de la Facultad Americana de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM, por sus siglas en inglés *American College of Veterinary Internal Medicine*) recomienda doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg vía oral cada 24 horas durante 28 días, una alternativa es aplicarla por vía intravenosa (Harrus *et al.* 2012, Allison y Little 2013).

Los reportes contradictorios referente a la eliminación de *E. canis* después del tratamiento con doxiciclina sugieren que la fase de la enfermedad durante la cual se inicia el tratamiento influye en los resultados definitivos; es por esto que se llevó a cabo un estudio en el que se evaluó la eficacia de un régimen de doxiciclina durante 28 días para la eliminación de *E. canis* en las tres fases de la enfermedad en perros inoculados experimentalmente. Diez perros fueron inoculados vía intravenosa con sangre infectada con *E. canis*, cuatro fueron tratados con doxiciclina durante la fase aguda, cuatro en la fase subclínica y dos en la fase crónica a una dosis de 10 mg/kg vía oral durante 28 días. La sangre recolectada de los perros en fase aguda o subclínica se volvieron PCR negativos para *E. canis* cuando los parámetros clínicos mejoraron, pero la sangre recolectada de los perros en la fase crónica permanecieron intermitentemente positivos a *E. canis* (McClure *et al.* 2010).

Se ha evidenciado una mejoría notoria en los signos clínicos en perros tratados con doxiciclina (10 mg/kg vía oral, dos veces al día durante 2 semanas) y cloroquina (2,5 mg/kg vía oral, dos veces al día durante 2 semanas) en comparación con perros tratados únicamente con doxiciclina. En este trabajo seis perros diagnosticados con infección por *E. canis* se trataron con doxiciclina y cloroquina y seis perros se trataron únicamente con doxiciclina. En ambos grupos se registró antes y después del tratamiento la temperatura corporal, hematología y bioquímica sérica (ALT, AST y BUN). Los datos hematológicos y bioquímicos se compararon en ambos grupos se registró y no hubo diferencias estadísticamente significativas. La temperatura corporal retornó a sus valores fisiológicos en ambos grupos. Todos los perros después de la infección manifestaron los clásicos signos clínicos de EMC (depresión, letargia, anorexia, pirexia y linfadenopatía). Después del tratamiento los perros tratados con doxiciclina y cloroquina mejoraron en los signos clínicos

mencionados anteriormente a excepción de la linfadenopatía que se mantuvo en algunos perros (Aysul *et al.* 2012).

Para evaluar la eficacia de la rifampicina (10 mg/kg vía oral cada 24 horas durante 3 semanas) se ha utilizado en perros infectados con *E. canis* y se ha observado una mejoría de los signos clínicos en especial ha habido resolución de la trombocitopenia pero no logra eliminar a *E. canis* de las muestras de sangre, médula ósea y aspirado de bazo (Theodorou *et al.* 2013).

En un estudio reciente se evaluó la eficacia terapéutica de una tableta genérica de doxiciclina (DoxiVet®) para la infección por *E. canis* en perros. Para esto, seis perros libres de infección y libres de garrapatas fueron infestados con garrapatas infectadas con *E. canis*. Una vez diagnosticados con *E. canis* por PCR y por el conteo de plaquetas se les empezó a administrar oralmente doxiciclina genérica una vez al día por 20 días consecutivos. La dosis real administrada osciló entre 10 mg/kg a 11,7 mg/kg. Se hizo análisis de PCR a los 28 días después de iniciado el tratamiento y la prueba no detectó *E. canis* en ninguno de los perros. En el día 56 del estudio se realizó una segunda determinación de PCR y cuatro perros resultaron positivos y un quinto perro resultó positivo para el día 70. Un sexto perro mantuvo los recuentos plaquetarios normales y fue dado de alta del estudio en el día 84. A los restantes cinco perros se les administró una segunda ronda de tratamiento durante 28 días. Se le realizó PCR al final del tratamiento y cuatro perros estaban negativos y se mantuvieron así durante los próximos tres meses. El quinto perro fue diagnosticado con *E. canis* a los 58 días después del segundo tratamiento. Los resultados indican que la doxiciclina (DoxiVet®) administrada a 10-11,7 mg/kg una vez al día durante 28 días consecutivos elimina la infección por *E. canis* en la mayoría de los perros (Fourie *et al.* 2015).

En regiones endémicas para *E. ewingii* no se debe esperar por la confirmación de infección en perros con signos clínicos compatibles con la ehrlichiosis granulocítica canina. Por lo general los perros responden al tratamiento 24 a 48 horas de instaurado el tratamiento con tetraciclina o doxiciclina. En estos casos se recomienda 10 mg/kg diariamente por vía oral durante 14 a 28 días. Puede ser necesario aplicar tratamiento de apoyo para los signos clínicos, utilizando analgésicos para la poliartropatía. Las evidencias sugieren que los perros pueden eliminar espontáneamente la infección dentro de varias semanas o meses. Los perros clínicamente sanos positivos a pruebas de inmunofluorescencia

indirecta en áreas endémicas no requieren de tratamiento (Cohn y Breitschwerdt 2012, Harrus *et al.* 2012).

El tratamiento documentado para *E. chaffeensis* en perros consiste en aplicar doxiciclina a razón de 5 mg/kg durante 14 a 28 días, sin embargo, los resultados indican que este tratamiento es menos efectivo para lograr la eliminación de este microorganismo que para *E. canis* y *E. ewingii* (Breitschwerdt *et al.* 1998, McQuiston *et al.* 2003).

PREVENCIÓN

La prevención de la ehrlichiosis y otras enfermedades transmitidas por garrapatas se logra principalmente al evitar que estas infesten a las mascotas y a los humanos, y en caso de infestación, con la eliminación de estas y el posterior tratamiento preventivo para evitar la reinfestación, asimismo, dado que la mayoría de las garrapatas se encuentran en el ambiente, debe incluirse un manejo profiláctico del entorno del animal (Dantas-Torres 2008, Starkey y Little 2012).

En caso de presentarse infestación por garrapatas, la eliminación de estas puede realizarse de dos maneras, mediante el uso de acaricidas o por extracción manual de forma mecánica (Dantas-Torres 2008, Greene *et al.* 2012, Starkey y Little 2012).

Para la extracción mecánica usualmente se utilizan pinzas o *forceps* diseñados para tal fin, la extracción se realiza halando suavemente al ácaro con la herramienta, sin dejar de ejercer presión, pero sin girar ni hacerlo de forma brusca porque parte del aparato bucal del ácaro pudiera quedar insertado dentro del huésped. Recomiendan que una vez removida la garrapata, esta debe ser depositada en un recipiente hermético o uno con alcohol, o eliminarla a través del WC del baño, pero no aplastarla con las manos, ya que el contacto con las heces o la hemolinfa de la garrapata puede ser un medio para la transmisión de microorganismos patógenos, adicionalmente se recomienda el uso de guantes al realizar tal labor (Dantas-Torres 2008, Greene *et al.* 2012, Starkey y Little 2012, CDC 2015).

El control químico y la prevención de la infestación mediante acaricidas puede realizarse mediante toda una gama de productos y presentaciones, las mismas incluyen jabones, champús, soluciones acaricidas, collares, *sprays*, productos de administración oral, inyectables y tabletas masticables (Dantas-Torres 2008, Campbell 2012, Greene *et al.* 2012, Walther *et al.*

2014, McTier *et al.* 2016).

Los compuestos activos de los acaricidas utilizados en mascotas constituyen un grupo de moléculas muy diversas, las mismas incluyen lactonas macrocíclicas (ivermectina, selamectina), organofosforados (diazinón, fentión), formamidas (amitraz), piretroides (cipermetrina, permetrina, deltametrina, flumetrina), fenilpirazoles (fipronil, piriprol) e isoxazolinas (fluralaner, afoxolaner, sarolaner) (Bishop *et al.* 2000, Dantas-Torres 2008, Beugnet y Franc 2012, Campbell 2012, Greene *et al.* 2012, Gassel *et al.* 2014, Otranto 2014, McTier *et al.* 2016).

Usualmente los productos comerciales contienen una o más de estas moléculas, incluyendo otros compuestos activos, de tal manera de hacerlos no solo específicos para diversas especies de garrapatas, sino que además funcionen para pulgas y otros insectos y ácaros (Greene *et al.* 2012).

La eficiencia y duración del efecto de los productos comerciales dependen del grado de infestación por garrapatas y del efecto residual del producto, el cual puede variar desde un mes, hasta varios meses (Dantas-Torres 2008, Starkey y Little 2012).

Bhoopathy *et al.* (2014) sintetizaron microesferas con base en el polímero poli-ε-caprolactona con una feromona sintética y deltametrina; bajo estas condiciones encontraron que la feromona potencia el efecto del acaricida, mostrando mayor mortalidad de *R. sanguineus* que las microesferas control que solo contenían deltametrina.

Rot *et al.* (2013) condujeron un ensayo en el cual se roció a huevos, larvas, ninfas y adultos de *R. sanguineus* con una suspensión de conidios del hongo *Metarhizium brunneum*, encontrando que ralentizaba el ciclo de vida de las garrapatas, disminuyendo el porcentaje de huevos, larvas, ninfas y adultos, disminuyendo además la tasa de alimentación de las garrapatas adultas.

El control no químico de garrapatas en el ambiente incluye labores culturales en las viviendas tales como mantener la grama corta y poca vegetación, y establecer barreras físicas para evitar la dispersión de las garrapatas, como por ejemplo, pisos de grava o concreto. En caso de vivir en zonas con alta población de garrapatas, evitar el contacto de las mascotas con la fauna y flora silvestre y utilizar vestimenta adecuada (Dantas-Torres 2008, Starkey y Little 2012).

El control químico de garrapatas en el ambiente, incluye tanto a las áreas de uso exclusivo de las mascotas, como las zonas aledañas a la vivienda, e incluso las habitaciones; generalmente se lleva a cabo mediante la aplicación de soluciones garrapaticidas, sin olvidar que tales productos son tóxicos y que el uso indiscriminado de los mismos puede conllevar a contaminación ambiental o al desarrollo de garrapatas resistentes (Dantas-Torres 2008).

Si bien se han realizado avances en el desarrollo de una vacuna a partir de una cepa atenuada de *E. canis*, aún no se ha desarrollado con éxito una vacuna comercial (Rudoler *et al.* 2012, McBride 2013, Rudoler *et al.* 2015). Un enfoque similar se ha aplicado para una vacuna contra *E. chaffeensis* presentando buena respuesta inmune y protección en perros (McGill *et al.* 2016).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR DM, CAVALCANTE GT, PINTER A, GENNARI SM, CAMARGO LMA, LABRUNA MB. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J. Med. Entomol.* 44(1):126-132.
- AGUIAR DM, ZHANG X, MELO ALT, PACHECO TA, MENESES AMC, ZANUTTO MS, HORTA MC, SANTARÉM VA, CAMARGO LMA, MCBRIDE JW, LABRUNA MB. 2013. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Vet. Microbiol.* 164(3-4):315-321.
- ALLEN MB, PRITT BS, SLOAN LM, PADDOCK CD, MUSHAM CK, RAMOS JM, CETIN N, ROSENBAUM ER. 2014. First reported case of *Ehrlichia ewingii* involving human bone marrow. *J. Clin. Microbiol.* 52(11):4102-4104.
- ALLISON RW, LITTLE SE. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 42(2):127-144.
- ALVES RN, LEVENHAGEN MA, LEVENHAGEN MMMD, RIECK SE, LABRUNA MB, BELETTI ME. 2014. The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Vet. Microbiol.* 168(2-4):442-446.
- ANDERSON BE, DAWSON JE, JONES DC, WILSON KH. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29(12): 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.
- AYSUL N, URAL K, CETINKAYA H, KUŞKUCU M, TOROS G, EREN H, DURUM C. 2012. Doxycycline-chloroquine combination for the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. *Acta Sci. Vet.* 40(2):1-7.
- BANETH G, HARRUS S, OHNONA FS, SCHLESINGER Y. 2009. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Vet. Microbiol.* 136(3-4):321-325.
- BAVARO MF, KELLY DJ, DASCH GA, HALE BR, OLSON P. 2005. History of U.S. military contributions to the study of rickettsial diseases. *Mil. Med.* 170(4 Suppl):49-60.
- BELL CA, PATEL R. 2005. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53(4):301-306.
- BEUGNET F, FRANC M. 2012. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent infestation by ectoparasites. *Trends Parasitol.* 28(7):267-279.
- BHOOPATHY D, LATHA BR, UMA TS, SREEKUMAR C, LEELA V. 2014. A novel approach to control brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* using sustained release poli-ε-caprolactone-pheromone microspheres. *Acta Parasitol.* 59(1):153-157.
- BISHOP BF, BRUCE CI, EVANS NA, GOUDIE AC, GRATION KAF, GIBSON SP, PACEY MS, PERRY DA, WALSH NDA, WITTY MJ. 2000. Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 91(3-4):163-176.
- BOOL PH, SUTMÖLLER P. 1957. *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130(9):418-420.
- BOWMAN DD. 2011. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*,

- Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*. Top. Companion. Anim. Med. 226(4):173-177.
- BREITSCHWERDT EB, COHN LA. 2012. Acute onset of canine granulocytic ehrlichiosis in a young dog (Sponsored by IDEXX). Disponible en línea en: <http://veterinarycalendar.dvm360.com/acute-onset-canine-granulocytic-ehrlichiosis-young-dog-sponsored-idexx> (Acceso 15.04.2016).
- 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(9):2645-2651.
- BREITSCHWERDT EB, HEGARTY BC, MAGGI R, HAWKINS E, DYER P. 2005. *Bartonella* species as a potential cause of epistaxis in dogs. J. Clin. Microbiol. 43(5):2529-2533.
- BREMER WG, SCHAEFER JJ, WAGNER ER, EWING SA, RIKIHISA Y, NEEDHAM GR, JITTAPALAPONG S, MOORE DL, STICH RW. 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitol. 131(1-2):95-105.
- BULLER RS, ARENS M, HMIEL SP, PADDOCK CD, SUMNER JW, RIKHISA Y, UNVER A, GAUDREAU-KEENER M, MANIAN FA, LIDDELL AM, SCHMULEWITZ N, STORCH GA. 1999. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. 341(3):148-155.
- CAMPBELL WC. 2012. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. Curr. Pharm. Biotechnol. 13(6):853-865.
- CAO WC, GAO YM, ZHANG PH, ZHANG XT, DAI QH, DUMLER JS, FANG LQ, YANG H. 2000. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from southern China. J. Clin. Microbiol. 38(7):2778-2780.
- CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). 2015. Tick removal. Disponible en línea en: http://www.cdc.gov/ticks/removing_a_tick.html (Acceso 15.06.2016).
- CHILDS JE, PADDOCK CD. 2003. The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States. Annu. Rev. Entomol. 48:307-337.
- CICUTTIN GL, TARRAGONA EL, DE SALVO MN, MANGOLD AJ, NAVA S. 2015. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. Ticks Tick Borne Dis. 6(6):724-729.
- COCAYNE CG, COHN LA. 2012. *Ehrlichia ewingii* infection (canine granulocytotropic ehrlichiosis). In: GREENE C (Ed). Infectious diseases of the dog and cat. Fourth edition. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri, pp. 241-244.
- CODNER EC, FARRIS-SMITH LL. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189(1):47-50.
- CODNER EC, MASLIN WR. 1992. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am. J. Vet. Res. 53(3):294-299.
- CODNER EC, CACECI T, SAUNDERS GK, SMITH CA, ROBERTSON JL, MARTIN RA, TROY GC. 1992. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am. J. Vet. Res. 53(12):2286-2291.
- COHN LA. 2003. Ehrlichiosis and related infections. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 33(4):863-884.
- COHN LA, BREITSCHWERDT EB. 2012. Spotlight on *Ehrlichia ewingii*. IDEXX Laboratories, Inc. Disponible en línea en: <https://identify.us.com/idmybug/ticks/tick-docs/spotlight-on-ehrlichia.pdf> (Acceso 08.04.2016).
- DA SILVA AS, MUNHOZ TD, FARIA JLM, VARGAS-HÉRNANDEZ G, MACHADO RZ, ALMEIDA TC, MORESCO RN, STEFANI LM, TINUCCI-COSTA M. 2013. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: effect on the pathogenesis of the disease. Vet. Microbiol. 164(3-4):366-369.
- DANTAS-TORRES F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Vet. Parasitol. 152(3-4):173-185.

- DANTAS-TORRES F, FIGUEREDO L, BRANDÃO-FILHO SP. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(1):64-67.
- DAVIDSON WR, LOCKHART JM, STALLNECHT DE, HOWERTH EW, DAWSON JE, REHAV Y. 2001. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection in white-tail deer. *J. Wildl. Dis.* 37(3):538-544.
- DAWSON JE, EWING SA. 1992. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 53(8):1322-1327.
- 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(8):1175-1179.
- DAY MJ. 2011. The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasit. Vectors.* 2011. 4:48.
- DE CAPRARIIS D, DANTAS-TORRES F, CAPELLI G, MENCKE N, STANNECK D, BREITSCHWERDT EB, OTRANTO D. 2011. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet. Microbiol.* 149(1-2):206-212.
- DE CASTRO MB, MACHADO RZ, DE AQUINO LPCT, ALESSI AC, COSTA MT. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119(1):73-86.
- DE TOMMASI AS, OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, CAPELLI G, BREITSCHWERDT EB, DE CAPRARIIS D. 2013. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasit. Vectors.* 6:97.
- DINIZ PPVP, DE MORAIS HSA, BREITSCHWERDT EB, SCHWARTZ DS. 2008. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 22(5):1136-1143.
- DO CARMO GM, CRIVELLENTI LZ, BOTTARI NB, MACHADO G, BORIN-CRIVELLENTI S, MORESCO RN, DUARTE T, DUARTE M, TINUCCI-COSTA M, MORSCH VM, SCHETINGER MRC, STEFANI LM, DA SILVA AS. 2015. Butyrylcholinesterase as a marker of inflammation and liver injury in the acute and subclinical phases of canine ehrlichiosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 43:16-21.
- DOYLE CK, LABRUNA MB, BREITSCHWERDT EB, TANG YW, CORSTVET RE, HEGARTY BC, BLOCH KC, LI P, WALKER DH, MCBRIDE JW. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *J. Mol. Diagn.* 7(4):504-510.
- DUMLER JS, BARBET AF, BEKKER CPJ, DASCH CA, 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 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(6):2145-2165.
- EBANI VV, VERIN R, FRATINI F, POLI A, CERRI D. 2011. Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy. *J. Wildl. Dis.* 47(3):699-703.
- ESTRADA-PEÑA A, JONGEJAN F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp. App. Acarol.* 23(9):685-715.
- EWING SA. 1963. Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 143:503-506.
- EWING SA, ROBERSON WR, BUCKNER RG, HAYAT CS. 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159(12):1771-1774.
- 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(3):368-374.

- FARIA JLM, DAGNONE AS, MUNHOZ TD, JOÃO CF, PEREIRA WAB, MACHADO RZ, TINUCCI-COSTA M. 2010. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2010. 19(2):98-102.
- FARIA JLM, MUNHOZ TD, JOÃO CF, VARGAS-HERNÁNDEZ G, ANDRÉ MR, PEREIRA WAB, MACHADO RZ, TINUCCI-COSTA M. 2011. *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20(1):71-74.
- FERREIRA RF, CERQUEIRA ADMF, DE CASTRO TX, FERREIRA EDO, NEVES FPG, BARBOSA AV, MACIEIRA DDB, ALMOSNY NRP. 2014. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 23(3):301-308.
- FERROLHO J, SIMPSON J, HAWES P, ZWEYGARTH E, BELL-SAKYI 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.
- FISHMAN Z, GONEN L, HARRUS S, STRAUSS-AYALI D, KING R, BANETH G. 2004. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. Vet. Parasitol. 119(1):21-26.
- FORLANO MD, MELÉNDEZ RD. 2013. Diagnóstico de *Hepatozoon* spp. en perros (*Canis familiaris*) y sus vectores en áreas rurales de los estados Lara y Yaracuy-Venezuela. Rev. Fac. Cs. Vet. UCV. 54(2):100-107.
- FORLANO M, MUJICA F, CORONADO A, MELÉNDEZ RD, LINARDI PM, BOTELHO JR, BELLOSTA P, BARRIOS N. 2008. Especies de *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) parasitando perros (*Canis familiaris*) en áreas rurales de los estados Lara, Yaracuy, Carabobo y Falcón, Venezuela. Rev. Cient. FCV-LUZ. 18(6):662-666.
- FOURIE JJ, HORAK I, CRAFFORD D, ERASMUS HL, BOTHA OJ. 2015. The efficacy of a generic doxycycline tablet in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. J. S. Afr. Vet. Assoc. 86(1):1193-1202.
- GARCÍA ME, MOISSANT E, PÉREZ A, QUIJADA J, SIMOES D, GARCÍA H. 2007. Comportamiento natural de las fases no parasíticas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) en un bioterio canino de Venezuela. Rev. Cient. FCV-LUZ. 17(6):566-571.
- GASSEL M, WOLF C, NOACK S, WILLIAMS H, ILG T. 2014. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. Insect Biochem. Mol. Biol. 45:111-124.
- GAUNT SD, BEALL MJ, STILLMAN BA, LORENTZEN L, DINIZ PPVP, CHANDRASHEKAR R, BREITSCHWERDT EB. 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. Parasit. Vectors. 3(1):33.
- GIEG J, RIKIHISA Y, WELLMAN M. 2009. Diagnosis of *Ehrlichia ewingii* infection by PCR in a puppy from Ohio. Vet. Clin. Pathol. 38(3):406-410.
- GOLDMAN EE, BREITSCHWERDT BE, GRINDEM CB, HEGARTY BC, WALLS JJ, DUMLER JS. 1998. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. J. Vet. Intern. Med. 12(2):61-70.
- 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.
- GREENE CE, WEESE JS, CALPIN JP. 2012. Environmental factors in infectious disease. In: GREENE C (Ed). Infectious diseases of the dog and cat. Fourth edition. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri, pp. 1078-1100.
- 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.
- GUERRERO R. 1996. Las garrapatas de Venezuela (Acarina: Ixodea). Listado de especies y clave para su identificación. Bol. Dir. Malariol. San. Am. 36(1-2):1-24.
- GUTIÉRREZ CN, MARTÍNEZ M, SÁNCHEZ E, DE VERA M, ROJAS M, RUIZ J, TRIANA-ALONSO

- FJ. 2008. Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. *Vet. Clin. Pathol.* 37(3):258-265.
- HAJDUŠEK O, ŠÍMA R, AYLLÓN N, JALOVECKÁ M, PERNER J, DE LA FUENTE J, KOPÁČEK P. 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3(26): 1-15.
- HARRUS S. 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet. J.* 204(3):239-240.
- HARRUS S, WANER T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J.* 187(3):292-296.
- HARRUS S, BARK H, WANER T. 1997a. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 19(4):431-444.
- HARRUS S, KASS PH, KLEMENT E, WANER T. 1997b. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.* 141(14):360-363.
- HARRUS S, WANER T, KEYSARY A, AROCH I, VOET H, BARK H. 1998. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62(1):15-27.
- HARRUS S, WANER T, BARK H, JONGEJAN F, CORNELISSEN AWCA. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37(9):2745-2749.
- HARRUS S, KENNY M, MIARA L, AIZENBERG I, WANER T, SHAW S. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(11):4488-4490.
- HARRUS S, WANER T, NEER M. 2012. *Ehrlichia canis* infection. In: GREENE C (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. Fourth edition. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri, pp. 227-238.
- HILDEBRANDT PK, HUXSOLL DL, WALKER JS, NIMS RM, TAYLOR R, ANDREWS M. 1973. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). *Am. J. Vet. Res.* 34(10):1309-1320.
- HOLDEN K, BOOTHBY JT, ANAND S, MASSUNG RF. 2003. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from a coastal region of California. *J. Med. Entomol.* 40(4):534-539.
- HUXSOLL DL, HILDEBRANDT PK, NIMS RM, AMYX HL, FERGUSON JA. 1970. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. *J. Wildl. Dis.* 6(4):220-225.
- INOKUMA H, TAMURA K, ONISHI T. 1996. Seasonal occurrence of *Rhipicephalus sanguineus* in Okayama Prefecture, Japan and effect of temperature on development of the tick. *J. Vet. Med. Sci.* 58(3):225-228.
- IQBAL Z, CHAICHANASIRIWITHAYA W, RIKIHISA Y. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32(7):1658-1662.
- JOHNSON EM, EWING SA, BARKER RW, FOX JC, CROW DW, KOCAN KM. 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 74(2-4):277-288.
- KAEWMONGKOL G, MANEESAAY P, SUWANNA N, TIRAPHUT B, KRAJARNGJANG T, CHOUYBUMRUNG A, KAEWMONGKOL S, SIRINARUMITR T, JITTAPALAPONG S, FENWICK SG. 2016. First detection of *Ehrlichia canis* in cerebrospinal fluid from a nonthrombocytopenic dog with meningoencephalitis by broad-range PCR. *J. Vet. Intern. Med.* 30(1):255-259.
- KELLY PJ. 2000. Canine ehrlichioses: an update. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 71(2):77-86.
- KIM CM, YI YH, YU DH, LEE MJ, CHO MR, DESAI AR, SHRINGI S, KLEIN TA, KIM HC, SONG JW, BAEK LJ, CHONG ST, O'GUINN ML, LEE JS, LEE IY, PARK JH, FOLEY J, CHAE JS. 2006. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9):5766-5776.

- KOCAN A, LEVESQUE GC, WHITWORTH LC, MURPHY GL, EWING SA, BARKER RW. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* 6(5):477-480.
- KOMNENOU AA, MYLONAKIS ME, KOUTI V, TENDOMA L, LEONTIDES L, SKOUNTZOU E, DESSIRIS A, KOUTINAS AF, OFRI R. 2007. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Vet. Ophthalmol.* 10(3):137-142.
- KORDICK SK, BREITSCHWERDT EB, HEGARTY BC, SOUTHWICK KL, COLITZ CM, HANCOCK SI, BRADLEY JM, RUMBOUGH R, MCPHERSON JT, MACCORMACK JN. 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 37(8):2631-2638.
- KOUTINAS CK, MYLONAKIS ME, O'BRIEN PJ, LEONTIDES L, SIARKOU VI, BREITSCHWERDT BE, KOUTINAS AF. 2012. Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring myelosuppressive and non-myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. J.* 194(2):259-261.
- KRAMER VL, RANDOLPH MP, HUI LT, IRWIN WE, GUTIERREZ AG, VUGIA DJ. 1999. Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(1):62-65.
- LEIVA M, NARANJO C, PEÑA MT. 2005. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Vet. Ophthalmol.* 8(6):387-393.
- LITTLE SE. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 40(6):1121-1140.
- LITTLE SE, O'CONNOR TP, HEMPSTEAD J, SAUCIER J, REICHARD MV, MEINKOTH K, MEINKOTH JH, ANDREWS B, ULLOM S, EWING SA, CHANDRASHEKAR R. 2010. *Ehrlichia ewingii* infection and exposure rates in dogs from the southcentral United States. *Vet. Parasitol.* 172(3-4):355-360.
- LIU Y, ZHANG Z, JIANG Y, ZHANG L, POPOV VL, ZHANG J, WALKER DH, YU XJ. 2011. Obligate intracellular bacterium *Ehrlichia* inhibiting mitochondrial activity. *Microbes. Infect.* 13(3):232-238.
- LOCATELLI C, STEFANELLO D, RISCAZZI G, BORGONOVO S, COMAZZI S. 2012. Pulmonary hypertension associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Vet. Rec.* 170(26):676.
- LOCKHART JM, DAVIDSON WR, DAWSON JE, STALLKNECH DE, LITTLE SE. 1997. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis* in the piedmont physiographic province of Georgia. *J. Parasitol.* 83(5):887-894.
- LONG SW, ZHANG X, ZHANG J, RUBLE RP, TEEL P, YU XJ. 2003. Evaluation of transovarial transmission and transmissibility of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 40(6):1000-1004.
- MAEDA K, MARKOWITZ N, HAWLEY RC, RISTIC M, COX D, MCDADE JE. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 316(14):853-856.
- MAGNARELLI LA, ANDERSON JF, STAFFORD KC3RD, DUMLER JS. 1997. Antibodies to multiple tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in white-footed mice. *J. Wildl. Dis.* 33(3):466-473.
- MANZANILLA J, GARCÍA ME, MOISSANT DE RE, GARCÍA F, TORTOLERO E. 2002. Dos especies de garrapatas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en perros del estado Aragua, Venezuela. *Entomotropica.* 17(2):177-180.
- 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(8):559-562.
- MASSA KL, GILGER BC, MILLER TL, DAVIDSON MG. 2002. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Vet. Ophthalmol.* 5(2):93-98.
- MATHEMA VB, MANZOOR Z, KOO JE, KOH YS. 2013. Inhibition of cell death of bone marrow-derived macrophages infected with *Ehrlichia muris*. *Ticks Tick Borne Dis.* 4(3):185-190.
- 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(11):4015-4023.
- MCBRIDE JW. 2013. *Ehrlichia*: Avances en vacunas, diagnóstico y patobiología. *Acta Med. Costarric.* 55(Suppl. 1):41-44.
- 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.* 54(12):5012-5020.
- MCDADE JE. 1990. Ehrlichiosis - A disease of animals and humans. *J. Infect. Dis.* 161(4):609-617.
- MCGILL JL, NAIR ADS, CHENG C, RUSK RA, JAWORSKI DC, GANTA RR. 2016. Vaccination with an attenuated mutant of *Ehrlichia chaffeensis* induces pathogen-specific CD4⁺ T cell immunity and protection for tick-transmitted wild-type challenge in the canine host. *PLoS One.* 11(2):e0148229.
- MCQUISTON JH, MCCALL CL, NICHOLSON WL. 2003. Ehrlichiosis and related infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223(12):1750-1756.
- MCTIER TL, CHUBB N, CURTIS MP, HEDGES L, INSKEEP GA, KNAUER CS, MENON S, MILLS B, PULLINS A, ZINSER E, WOODS DJ, MEEUS P. 2016. Discovery of sarolaner: a novel, oral administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Vet. Parasitol.* 222:3-11.
- MORAES-FILHO J, MARCILI A, NIERI-BASTOS FA, RICHTZENHAIN LJ, LABRUNA MB. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 117(1):51-55.
- MORAES-FILHO J, KRAWCZAK FS, COSTA FB, SOARES JF, LABRUNA MB. 2015. Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS ONE.* 10(9):e0139386.
- MOUMÈNE A, MEYER DF. 2015. *Ehrlichia*'s molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes. Infect.* 18(3):172-179.
- MUNHOZ TD, FARIA JLM, VARGAS-HÉRNANDEZ G, FAGLIARI JJ, SANTANA AE, MACHADO RZ, TINUCCI-COSTA M. 2012. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21(3):206-212.
- MURPHY GL, EWING SA, WHITWORTH LC, FOX JCM, 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(4):325-339.
- 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.* 2:91(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.
- MYLONAKIS ME, KRITSEPI-KONSTANTINOY M, DUMLER JS, DINIZ PPVP, DAY MJ, SIARKOU VI, BREITSCHWERDT EB, PSYCHAS V, PETANIDES T, KOUTINAS AF. 2010a. Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J. Vet. Intern. Med.* 24(3):633-638.
- MYLONAKIS ME, SIARKOU VI, KOUTINAS AF. 2010b. Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an update on the pathogenesis, diagnosis and management. *Isr. J. Vet. Med.* 65(4):129-135.
- MYLONAKIS ME, BORJESSON DL, LEONTIDES L, SIARKOU VI, THEODOROU K, KOUTINAS AF. 2011. Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Clin. Pathol.* 40(1):78-83.
- NAIR ADS, CHENG C, JAWORSKI DC, WILLARD LH, SANDERSON MW, GANTA RR. 2014. *Ehrlichia chaffeensis* infection in the reservoir host (white-tailed deer) and in an incidental host (dog) is impacted by its prior

- growth in macrophage and tick cell environments. *PLoS One*. 9(10):e109056.
- NAIR ADS, CHENG C, GANTA CK, SANDERSON MW, ALLEMAN AR, MUNDERLOH UG, GANTA RR. 2016. Comparative experimental infection study in dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS One*. 11(2):e0148239.
- NDIP LM, NDIP RN, ESEMU SN, DICKMU VL, FOKAM EB, WALKER DH, MCBRIDE JW. 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* 111(1-2):59-66.
- NDIP LM, NDIP RN, NDIVE VE, AWUH JA, WALKER DH, MCBRIDE JW. 2007. *Ehrlichia* species in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Cameroon. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7(2):221-227.
- NORMAND T, FOREST L, CHABANNE L, RICHARD S, DAVOUST B, JUILLARD V. 2009. Gamma IFN *Ehrlichia canis*-specific cell responses. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(Suppl 2):70-71.
- OLIVEIRA LS, OLIVEIRA KA, MOURÃO LC, PESCATORE AM, ALMEIDA MR, CONCEIÇÃO LG, GALVÃO MAM, MAFRA C. 2009. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(Suppl. 2):55-56.
- ORÍ AP, PEREIRA PM, LAUS JL. 2004. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Ciênc. Rural.* 34(4):1289-1295.
- ORÍ AP, DÓREA NETO FA, MACHADO RZ, SANTANA ÁE, GUERRA JL, DA SILVA VLD, BEDFORD PGC, LAUS JL. 2008. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.* 15(2):94-97.
- OTRANTO D. 2014. NEXGARD®. Afoxolaner, a new oral insecticide-acaricide to control fleas and ticks in dogs. *Editorial. Vet. Parasitol.* 201(3-4):177-178.
- PADDOCK CD, CHILDS JE. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1):37-64.
- PANCIERA RJ, EWING SA, CONFER AW. 2001. Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. *Vet. Pathol.* 38(1):43-46.
- PAROLA P, RAOULT D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect Dis.* 32(6):897-928.
- PEREIRA LS, OLIVEIRA PL, BARJA-FIDALGO C, DAFFRE S. 2001. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Parasitol.* 2001. 99(2):66-72.
- PEREZ M, RIKIHISA Y, WEN B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34(9):2133-2139.
- PEREZ M, BODOR M, ZHANG C, XIONG Q, RIKIHISA Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:110-117.
- PRICE JE, SAYER PD. 1983. Canine ehrlichiosis. *In: KIRK RW (Ed.). Current veterinary therapy.* Vol. VII. Saunders W. B. Co., Philadelphia, pp. 1197-1202.
- PROCAJLO A, SKUPIEŃ EM, BLADOWSKI M, LEW S. 2011. Monocytic ehrlichiosis in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 14(3):515-520.
- RAMÍREZ-BARRIOS RA, CHACÍN E, BARBOZA G, FERNÁNDEZ G, VALERA Z, VILLALOBOS A, ANGULO-CUBILLÁN F. 2008. Garrapatas (Acari: Ixodidae) recolectadas de caninos bajo asistencia veterinaria en Maracaibo, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 18(3):267-270.
- REGAN J, MATTHIAS J, GREEN-MURPHY A, STANEK D, BERTHOLF M, PRITT BS, SLOAN LM, KELLY AJ, SINGLETON J, MCQUISTON JH, HOCEVAR SN, WHITTLE JP. 2013. A Confirmed *Ehrlichia ewingii* infection likely acquired through platelet transfusion. *Clin. Inf. Dis.* 56(12):105-107.
- RIKIHISA Y. 2006. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(1):95-101.
- RIKIHISA Y. 2010a. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(5):328-339.
- RIKIHISA Y. 2010b. Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis*

- and *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167(2-4):155-166.
- RIKIHISA Y. 2015. Molecular Pathogenesis of *Ehrlichia chaffeensis*. *Infection. Annu. Rev. Microbiol.* 69:283-304.
- RISTIC M, HUXSOLL D. 1984. Tribu II. *Ehrlichiae*. *In: KRIEG NR, HOLT JC (Eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. I. The William & Wilkins Co., Baltimore, pp. 704-709.*
- ROLAND WE, EVERETT ED, CYR TL, HASAN SZ, DOMMARAJU CB, McDONALD GA. 1998. *Ehrlichia chaffeensis* in Missouri ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(4):641-643.
- 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.
- ROT A, GINDIN G, MENT D, MISHOUTCHENKO A, GLAZER I, SAMISH M. 2013. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Vet. Parasitol.* 193(1-3):229-237.
- RUDOLER N, BANETH G, EYAL O, VAN STRATEN M, HARRUS S. 2012. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine.* 31(1):226-233.
- RUDOLER N, HARRUS S, MARTINEZ-SUBIELA S, TVARIJONAVICIUTE A, VAN STRATEN M, CERÓN JJ, BANETH G. 2015. Comparison of the acute phase protein and antioxidant responses in dogs vaccinated against canine monocytic ehrlichiosis and naive-challenged dogs. *Parasit. Vectors.* 8:175.
- SIMPSON CF. 1974. Relationship of *Ehrlichia canis*-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. *Infect. Immun.* 10(3):590-596.
- SKOTARCZAK B. 2003. Canine ehrlichiosis. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10:137-141.
- SOSA-GUTIÉRREZ CG, QUINTERO MARTINEZ MT, GAXIOLA CAMACHO SM, COTA GUAJARDO S, ESTEVE-GASSENT MD, GORDILLO-PÉREZ MG. 2013. Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic ehrlichiosis in dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *J. Vet. Med.* 2013. Article ID 797019, 3 p.
- SOSA-GUTIÉRREZ CG, VARGAS M, TORRES J, GORDILLO-PÉREZ G. 2014. Tick-borne rickettsial pathogens in rodents from Mexico. *J. Biomed. Sci. Eng.* 7:884-889.
- STARKEY L, LITTLE S. 2012. Defeating ticks. Practical tips for preventing tick-borne disease in pets. *Today Vet. Pract.* 2(5):40-44.
- STARKEY LA, BARRETT AW, BEALL MJ, CHANDRASHEKAR R, THATCHER B, TYRREL P, LITTLE SE. 2015. Persistent *Ehrlichia ewingii* infection in dogs after natural tick infestation. *J. Vet. Intern. Med.* 29(2):552-555.
- STEIERT JG, GILFOY F. 2002. Infection rates of *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* by *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in southwest Missouri. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2(2):53-60.
- 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-digest-articles/> (Acceso: 25.02.2016).
- THEODOROU K, MYLONAKIS ME, SIARKOU VI, LEONTIDES L, KOUTINAS AF, KOUTINAS CK, KRITSEPI-KONSTANTINOY M, BATZIAS G, FLOURAKI E, EYAL O, KONTOS V, HARRUS S. 2013. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(7):1619-1626.
- TOMASSONE L, NUÑEZ P, GÜRTLER RE, CEBALLOS LA, OROZCO MM, KITRON UD, FARBER M. 2008. Molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* ticks, Argentina. *Emerging Inf. Dis.* 14(12):1953-1955.
- TORINA A, BLANDA V, ANTOCI F, SCIMECA S, D'AGOSTINO R, SCARIANO E, PIAZZA A, GALLUZZO P, GIUDICE E, CARACAPPA S. 2013. A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. *Transbound Emerg. Dis.* 60(Suppl. 2):125-130.

- UNVER A, PEREZ M, ORELLANA N, HUANG H, RIKIHISA Y. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 39(8):2788-2793.
- VARELA-STOKES AS. 2007. Transmission of bacterial agents from lone star ticks to white-tailed deer. *J. Med. Entomol.* 44(3):478-483.
- WALSER-REINHARD L, SCHAARSCHMIDT-KIENER D, FORSTER JL, MATHEIS F, SPIESS B. 2012. Direct detection of *Ehrlichia canis* by PCR in the conjunctiva of a dog with bilateral anterior uveitis. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 154(4):149-152.
- WALTHER FM, ALLAN MJ, ROEPKE RKA, NUERNBERGER MC. 2014. Safety of fluralaner chewable tablets (Bravecto™), a novel systemic antiparasitic drug, in dogs after oral administration. *Parasit. Vectors.* 7:87.
- WANER T, HARRUS S. 2013. Canine monocytic ehrlichiosis – From pathology to clinical manifestations. *Isr. J. Vet. Med.* 68(1):12-18.
- 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(3-4):307-317.
- WILLIAMSON PC, BILLINGSLEY PM, TELTOW GJ, SEALS JP, TURNBOUGH MA, ATKINSON SF. 2010. *Borrelia*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* spp. in ticks removed from persons, Texas, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 16(3):441-446.
- XIONG Q, BAO W, GE Y, RIKIHISA Y. 2008. *Ehrlichia ewingii* infection delays spontaneous neutrophil apoptosis through stabilization of mitochondria. *J. Infect. Dis.* 197(8):1110-1118.
- YABSLEY MJ, ADAMS DS, O'CONNOR TP, CHANDRASHEKAR R, LITTLE SE. 2011. Experimental primary and secondary infections of domestic dogs with *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* 150(3-4):315-321.
- YU DH, LI YH, YOON JS, LEE JH, LEE MJ, YU IJ, CHAE JS, PARK JH. 2008. *Ehrlichia chaffeensis* infection in dogs in South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8(3):355-358.
- ZHANG JZ, POPOV VL, GAO S, WALKER DH, YU XJ. 2007. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. *Cell. Microbiol.* 9(3):610-618.
- ZHANG XF, ZHANG JZ, LONG SW, RUBLE RP, YU XJ. 2003. Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. *J. Med. Microbiol.* 52(11):1021-1026.