

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“ESTUDIO RETROSPECTIVO DE *EHRlichia canis* EN UN HOSPITAL
VETERINARIO DE LA CD. DE CHIHUAHUA, CHIH.”**

POR:

JESÚS RICARDO GÁMEZ PIÑÓN

TESIS

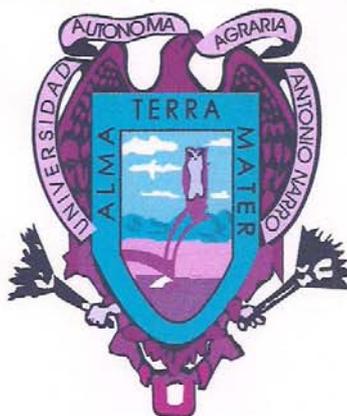
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2010

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

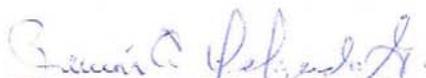


"ESTUDIO RETROSPECTIVO DE *EHRlichia canis* EN UN HOSPITAL
VETERINARIO DE LA CD. DE CHIHUAHUA, CHIH."

POR:

JESUS RICARDO GAMEZ PIÑON

ASESOR PRINCIPAL


MCV Ramón A. Delgado González

Presidente

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



MVZ Rodrigo I. Simón Alonso



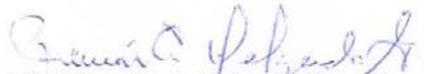
Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

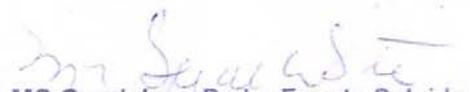
TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

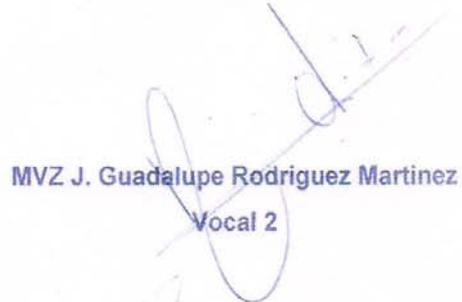
JUNIO 2010

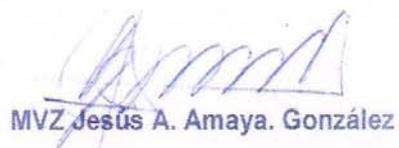
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL




MCV Ramón A. Delgado González
Presidente


MC Guadalupe De La Fuente Salcido
Vocal 1


MVZ J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Vocal 2


MVZ Jesús A. Amaya. González
Vocal suplente

ÍNDICE GENERAL

	Página
Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Resumen	iii
Introducción	1
Revisión de Literatura	2
Historia	2
Etiología y taxonomía	2
Epidemiología	3
Inmunología	6
Patogenia	9
Signos	11
Lesiones	13
Diagnóstico	13
Prevención y Control	15
Tratamiento	16
Justificación	18
Objetivo	19
Materiales y Métodos	20
Resultados	22
Discusión	26
Conclusión	27
Literatura Citada	28

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características de los géneros <i>Rickettsia</i> , <i>Ehrlichia</i> y <i>Chlamydia</i> .	3
Cuadro 2. Hospedadores primarios y experimentales de especies de rickettsias.	6
Cuadro 3. Signos clínicos observados en los casos de estudio.	22
Cuadro 4. Edad de los perros positivos a <i>Ehrlichia canis</i> .	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación taxonómica de las <i>Rickettsias</i> .	4
Figura 2. Procedimiento de la prueba de ELISA practicada para el diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i> .	20
Figura 3. Signos clínicos observados en los casos de estudio.	24
Figura 4. Animales positivos por edad en años.	25

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen por darme la fuerza necesaria para terminar mi carrera lejos de mi familia.

A la UAAAN, por creer en mi y darme la oportunidad de hacer mi carrera en esta Universidad.

A mis amigos y amigas que hicieron placentera mi estancia en esta universidad y a aquellos que me brindaron su casa cuando no tenía a donde ir.

A mis maestros que durante toda la carrera estuvieron conmigo y con sus enseñanzas, consejos y amistad brindada me ayudaron a terminar mis estudios.

A los super buitres de béisbol y a mi manager y gran amigo el señor Francisco “Chino” Galindo que son como una familia para mí, ya que con sus bromas y entrega al deporte hicieron que valiera la pena pasar todas las tardes bajo el sol candente de la Laguna.

A la Doctora María De Lourdes Bolaños Tinoco, por permitirme hacer prácticas y realizar esta investigación en su hospital veterinario.

DEDICATORIA

A mis padres Ricardo y Leticia por creer en mí, por estar tan lejos y a la vez tan cerca de mí, apoyándome incondicionalmente y en todo momento.

A mi hermano David por ser una persona ejemplar y servirme como inspiración y motivación para superarme como ser humano.

A mis hermanas Sonia y Guadalupe por darme el ejemplo de formarme como profesionalista y por apoyarme en todo momento.

A mis cuñados Manuel, Jesús y a mis sobrinos Gael, Elian, Diego y Santino que aunque llegaron mas tarde a mi vida ya son parte de ella.

RESUMEN

La Erliquiosis Monocítica Canina es reconocida como una enfermedad infecciosa importante de distribución mundial y potencialmente fatal de los perros y otros miembros de la familia *Canidae*. Es ocasionada por *Ehrlichia canis* y transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* de manera natural. El presente estudio se realizó con la finalidad de relacionar los principales signos clínicos de la enfermedad, observados en la ciudad de Chihuahua Chihuahua, así como conocer si la frecuencia de presentación varía en relación con la edad de los caninos en esta ciudad. Se analizaron los expedientes de pacientes archivados en un hospital veterinario en la ciudad de Chihuahua, se analizaron datos de 68 caninos de 1 a 15 años de edad, que fueron diagnosticados con erliquiosis monocítica canina por medio de un análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los resultados encontrados se organizaron y se graficaron tomando en cuenta la edad y los signos clínicos que presentaron, llegando a la conclusión de que la enfermedad se ha presentado más comúnmente en animales de edad temprana y en cuanto a los signos que presentaron estos animales hay mucha variación, pero el estudio mostró que hay 6 signos que se presentaron con más frecuencia: fiebre (55.9%), caquexia (16.2%), neumonía (13.2%), hematuria (10.3%), epistaxis (9.1%) y artritis (8.8%) en los caninos infectados.

Palabras claves: *Ehrlichia canis*, *Erliquiosis Monocítica Canina*, *Rhipicephalus sanguineus*, *caninos*, *monocitos*.

INTRODUCCIÓN

La Erliquiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad causada por una bacteria que infecta a los perros y otros mamíferos incluyendo el hombre (Pusterla y col., 2000). Es reconocida como una enfermedad infecciosa importante a nivel mundial (Knowles y col., 2003; Marsilio y col., 2006; Doyle y col., 2006). Se presenta con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales (Vinasco y col., 2007; Allsopp y col., 2001; Felek y Rikihisa, 2003a; Ohashi y col., 2001).

El agente etiológico de la erliquiosis es una bacteria intracelular obligada (Wen y col., 1997; Luo y col., 2009; McBride y col., 2007; Mavromatis y col., 2006; Branger y col., 2004; Shankarappa y col., 1992; Brouqui y col., 1994), Gram-negativa (Vinasco y col., 2007; Popov y col., 1998; Branger y col., 2004), son varias las especies de *Ehrlichia* capaces de infectar al perro (Cardenas y col. M., 2007; Breitschwerdt y col., 1998; Nethery y col., 2007), pero mundialmente *Ehrlichia canis* (*E. canis*) es la especie que tiene la mayor importancia. Ésta es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Wen y col., 1997; Vinasco y col., 2007; Lopez y col., 2007; Marsilio y col., 2006; Mavromatis y col., 2006; Alleman y col., 2001; Parola y col., 2003; Ohashi y col., 2001; Kakoma y col., 1994), e infecta predominantemente células mononucleares (Mavromatis y col., 2006).

Una vez que el animal ha sido infectado, el síndrome progresa a través de varias fases: aguda, subclínica y crónica (Rikihisa y col., 1992; Lopez y col., 2007; Mavromatis y col., 2006; Felek, 2003a; Schaefer y col., 2007). Si bien *E. canis* fue identificada por primera vez en Algeria en 1935 (Harrus y col., 1998b; Mavromatis y col., 2006; Chen y col., 1994), fue hasta 1987 que se le prestó atención cuando la *Ehrlichia chaffeensis*, un microorganismo muy emparentado con *E. canis*, fue identificado como la causa de la Erliquiosis Monocítica Humana. *E. canis*, hasta la fecha, sólo se ha aislado de una forma asintomática en humanos (OIE, 2005).

E. canis es una bacteria que se presenta con frecuencia en perros de todo el mundo y es diagnosticada constantemente en las clínicas veterinarias, sin embargo los reportes son escasos, por tal motivo se realiza el presente estudio de la presencia de la riquetsia en la Cd. de Chihuahua, Chih.

REVISION DE LITERATURA

Historia

La enfermedad fue reconocida por primera vez como una entidad clínica distinta en Argelia en 1935 (Harrus y col., 1998b; Mavromatis y col., 2006; Chen y col., 1994), sur de la India y otras partes de África en la década de los 40's (Zhang y col., 2008), en 1963 en los Estados Unidos (Mcbride y col., 1999), Medio Oriente y en el Oriente (Rikihisa y col., 1992; Zhang y col., 2008; Keysary y col., 2001).

E. canis era relativamente desconocida hasta que fue asociada con brotes epidémicos en Singapur y Malasia desde 1963 hasta 1968 (Zhang y col., 2008).

La enfermedad cobró mucha importancia durante la Guerra de Vietnam (Keysary y col., 2001; Zhang y col., 2008; Warner y Harrus, 2000), ya que durante ésta, 160 perros militares estadounidenses murieron a causa de infecciones por *E. canis* (Rikihisa y col., 1992). La erliquiosis se reconoció en perros en los Estados Unidos en 1962, actualmente es reconocida en gran parte del mundo (Rikihisa y col., 1992). El interés aumentó cuando en 1987 *Ehrlichia chaffeensis*, un organismo muy emparentado, fue identificado como la causa de la Erliquiosis Monocítica Humana (Warner y Harrus, 2000). *E. canis*, hasta la fecha, sólo se ha aislado de una forma asintomática en humanos (OIE, 2005).

Etiología y taxonomía

La EMC es causada por *E. canis* (Marsilio y col., 2006; Magnarelli y col., 1990), ocasionalmente *Ehrlichia platys* y *Ehrlichia chaffeensis* (OIE, 2005; Cardenas y col., 2007; Breitschwerdt y col., 1998; Nethery y col., 2007), por otra parte, la erliquiosis monocítica humana es causada por *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii* (OIE, 2005).

La *Ehrlichia* es miembro de la familia *Rickettsiaceae* (Brouqui y col., 1992; Perez y col., 1996; Magnarelli y col., 1993), es una bacteria Gram negativa (Vinasco y col., 2007; Popov y col., 1998; Branger y col., 2004), cocoide pleomórfica pequeña (Warner y Harrus, 2000). Es un

patógeno intracelular obligado (Wen y col., 1997; Luo y col., 2009; McBride y col., 2007; Mavromatis y col., 2006; Branger y col., 2004; Shankarappa y col., 1992; Brouqui y col., 1994).

Dentro de su ciclo biológico se pueden distinguir diferentes formas: cuerpos elementales, que tienen un diámetro de 0,5-0,9 μ y se dividen por fisión binaria para dar lugar a los cuerpos iniciales, de 1,5-2,5 μ , que a su vez se dividen produciéndose las típicas mórulas, formadas incluso por más de 40 cuerpos elementales que pueden llegar a tener un tamaño de 4-5 μ (IDEXX, 2010).

Las *Ehrlichias* se replican dentro de fagosomas en el citoplasma de mononucleares (Allsopp y col., 2001; Teng y col., 2003; Felek, 2003b) polimorfonucleares o plaquetas (Ohashi y col., 1998). *E. canis* se replica dentro de las células sanguíneas mononucleares (Hildebrandt y col., 1973; Branger y col., 2004). *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia equi*, infectan principalmente neutrófilos (Pusterla y col., 1998).

Morfológicamente, los miembros del género *Ehrlichia* no parecen contener cantidades significativas de peptidoglicano (Rikihisa, 1991b).

El género *Ehrlichia* está estrechamente relacionado con *Anaplasma*, cuyos miembros tienen una existencia similar obligatoriamente intracelular (Mavromatis y col., 2006).

Cuadro 1. Características de los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Chlamydia*.

Genus	Replication site	Developmental cycle	Muramic acid	Glutamine or glutamate oxidation	Genome size (MDa)	Primary host cells	Arthropod association
<i>Rickettsia</i>	Cytoplasm	Simple	Present	Yes	1,100	Endothelial cells	Yes
<i>Ehrlichia</i>	Membrane vacuole	Complex?	Low?	Yes	?	Leukocytes	Yes (some)
<i>Chlamydia</i>	Membrane vacuole	Complex	Absent	No	660	Epithelial cells of mucous membrane	No

(Rikihisa, 1991b).

Epidemiología

La enfermedad es también conocida como pancitopenia tropical canina (Stich y col., 2002; Shankarappa y col., 1992; McBride y col., 1999) rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador y tifus de la garrapata canina (Warner y Harrus, 2000).

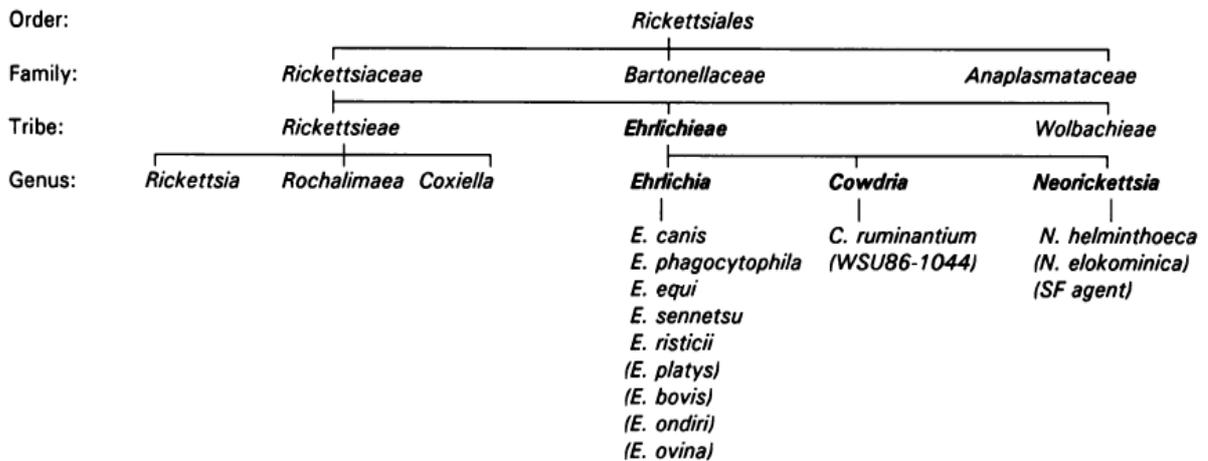


Figura 1. Clasificación taxonómica de las Rickettsias (Rikihisa, 1991b).

E. canis puede infectar a los perros, lobos y chacales (Mcbride y col., 2007), que también son los reservorios (Pusterla y col., 2000). En perros, la Erliquiosis es reportada en todo el año, debido a la evolución clínica prolongada (OIE, 2005).

Tiene una amplia distribución en el orden mundial (Knowles y col., 2003; Marsilio y col., 2006; Doyle y col., 2006; Knowles y col., 2003), con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales (Vinasco y col., 2007; Allsopp y col., 2001; Felek, 2003a; Ohashi y col., 2001).

Las Ehrlichias son transmitidas por garrapatas de la familia Ixodidae (OIE, 2005). La garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, es el vector primario para la transmisión de *E. canis* (Wen y col., 1997; Vinasco y col., 2007; Lopez y col., 2007; Marsilio y col., 2006; Mavromatis y col., 2006; Alleman y col., 2001; Parola y col., 2003; Ohashi y col., 2001; Kakoma y col., 1994).

Recientemente también se demostró que se transmite experimentalmente por *Dermacentor variabilis*, la garrapata del perro americano (Branger y col., 2004; Felek, 2003a; OIE, 2005). La transmisión canina experimental de *E. canis* granulocítica por *Amblyomma americanum* también ha sido reportada (Rikihisa, 1991b).

Los perros pueden ser infectados de forma crónica, sin signos por más de 5 años. Así, los cánidos salvajes y domésticos se consideran el reservorio natural de *E. canis* (Rikihisa, 1991b; Mavromatis y col., 2006).

Un organismo que parece ser una cepa de *E. canis* fue recientemente aislado de un ser humano con infección crónica asintomática en Venezuela (Branger y col., 2004; Nicholson y col., 1998). La misma cepa fue aislado de los perros locales (Branger y col., 2004).

Ehrlichia chaffeensis se transmite principalmente por *Amblyomma americanum*, la garrapata también es considerada como el vector primario para *Ehrlichia ewingii* (OIE, 2005).

Ehrlichia platys, también se cree que es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* e infecta las plaquetas y los conduce a la trombocitopenia cíclica (Pusterla y col., 1998).

Las garrapatas transmiten la enfermedad transestadial, pero no transováricamente (Rikihisa, 1991b).

La transmisión en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* ocurre entre estados de desarrollo y no transováricamente. Se ha demostrado que las larvas y las ninfas se infectan al alimentarse de perros con enfermedad. La reciente demostración del ADN de *Ehrlichia* en la sangre de perros infectados persistentemente, clínicamente sanos, 34 meses después de la infección experimental, sugiere que los perros en estadio subclínico también pueden ser una fuente de infección. En la garrapata la *Ehrlichia* se disemina desde el intestino a las glándulas salivares a través de las células sanguíneas. Al alimentarse, las garrapatas inyectan en el lugar, las secreciones de las glándulas salivares contaminadas con *Ehrlichia canis*. Los tres estados (larva, ninfa y adulto), son capaces de transmitir la enfermedad. Se ha demostrado que las garrapatas pueden sobrevivir como adultos de 155 a 568 días sin alimentarse y transmitir la infección por 155 días después de infectarse. Este fenómeno permite a las garrapatas sobrevivir durante el invierno e infectar a los huéspedes en la primavera siguiente. Las garrapatas son más abundantes durante las estaciones cálidas y la mayoría de los casos agudos de EMC ocurren durante esos períodos (Warner y Harrus, 2000).

Las especies zoonóticas son *Ehrlichia chaffeensis*, y *Ehrlichia ewingii*. *Ehrlichia canis* también puede ser zoonótica, pero esta todavía está por confirmar (OIE, 2005).

Las infecciones también se pueden transmitir por transfusiones de sangre, y la transmisión mecánica por insectos picadores se ha sugerido como un posible medio de propagación. Los organismos viables han ha encontrado en muestras refrigeradas a 4 ° C durante un máximo de una semana (Branger y col., 2004).

Los organismos viables se han encontrado en muestras refrigeradas a 4 °C durante un máximo de una semana (OIE, 2005).

Cuadro 2. Hospedadores primarios y experimentales de especies de *Rickettsias*.

Species	Primary host	Experimental host (reference)
<i>E. sennetsu</i>	Human	Mouse (57, 113), nonhuman primates (116, 159) but not horse (148)
<i>E. risticii</i>	Horse	Mouse (140), cat (28), dog (154), nonhuman primate (166)
<i>E. canis</i>	Canidae	None; nonhuman primate not infected (99)
<i>E. phagocytophila</i>	Ruminants	Guinea pig, mouse (52)
<i>E. equi</i>	Horse	Cat, dog (101), sheep, goat (164), nonhuman primate (101) but not mouse, rat, guinea pig, rabbit, or cow (164)
<i>E. ondiri</i>	Ruminants	Not in mouse, guinea pig, or hamster (23)
<i>C. ruminantium</i>	Ruminants	Mouse (some strains) (12)
WSU86-1044	Cattle	None
<i>N. helminthoeca</i>	Canidae	None
<i>N. elokominica</i>	Canidae, bear, raccoon, ferret	None
SF agent	Unknown	Mouse (59), dog (60)

(Rikihisa, 1991b).

Inmunología

E. canis subespecie *granulocítica* (GCE) y *E. canis* presentan antigénicamente reacción cruzada en un grado limitado, pero al parecer no se cruzan en cuanto a protección inmunológica (Rikihisa y col., 1992). *Ehrlichia risticii* y *E. canis* no presentan reacción inmunológica cruzada significativa (Kakoma y col., 1994). En cambio se ha informado sobre reactividad inmunológica cruzada entre *E. canis* y *Ehrlichia sennetsu* (Rikihisa, 1991a).

E. canis, fue empleado como un antígeno sustituto para el diagnóstico serológico de erliquiosis en humanos (Rikihisa y col., 1994a; Unver y col., 1999).

Perros infectados con *E. canis* desarrollan anticuerpos contra un grupo relativamente bien definido de proteínas que constituyen las principales proteínas inmunorreactivas de *Ehrlichia* (Nethery y col., 2007).

Unas glicoproteínas de la *Ehrlichia* son altamente inmunogénicas, destacando un papel potencial en el desarrollo de inmunidad protectora (Doyle y col., 2006).

La formación de anticuerpos es rápida contra este organismo. Para los 20 días postinfección, el 100% de los perros son seropositivos y con perros tratados, el pico de títulos de anticuerpos se presentan a los 80 días postinfección (Rikihisa, 1991b).

A pesar de la creciente evidencia de que la inmunidad humoral puede jugar un papel en la protección contra patógenos bacterianos intracelulares, a menudo se acepta que la inmunidad celular es la forma dominante de protección durante las infecciones bacterianas intracelulares (Bitsaktsis y col., 2007).

E. canis se caracteriza por las inclusiones intracitoplasmáticas que produce en los monocitos circulantes, linfocitos y rara vez los neutrófilos que se han denominado mórulas (Hildebrandt y col., 1973; Branger y col., 2004).

Los estudios experimentales han demostrado que los perros siguen siendo seropositivos a *E. canis* durante muchos meses después de eliminar la infección, Porque los perros a menudo permanecen seropositivos durante períodos prolongados, puede ser importante para reconsiderar la utilidad de la serología para diferenciar verdaderos portadores de animales que se cura de la infección por *Ehrlichia* (Mathew y col., 2000).

No hay predilección por edad o sexo y todas las razas pueden ser infectadas con *E. canis*. Sin embargo, los perros pastor alemán parecen ser más susceptibles a la EMC que otras razas. Por otra parte, la enfermedad es más grave y tiene un pronóstico peor que en otras razas. Las diferencias en la

susceptibilidad a la raza puede ser atribuido a una diferencia en la capacidad de montar respuesta celular y / o respuesta inmune de tipo humoral adecuada

(Harrus y col., 1999).

Se ha documentado que la respuesta inmune celular contra *E.canis* está deprimido en comparación con la respuesta inmune celular de perros Beagle. En el mismo estudio, no hubo diferencias significativas en la respuesta humoral se observaron entre las dos razas. Estos hallazgos sugieren que la respuesta inmune celular es la componente más importante del sistema inmune proporcionando la protección contra *E. canis*. Así pues, la respuesta inmune humoral no parece desempeñar un papel importante en la protección contra la *E. canis*; por el contrario, se ha propuesto contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Harrus y col., 1999).

Un estado de inmunidad protectora se cree que ocurre en perros infectados con *E. canis*, también en los perros infectados después del tratamiento a corto plazo con oxitetraciclina. Parece que la inmunidad protectora en la erliquiosis monocítica canina se mantiene principalmente a través de la respuesta inmune celular en lugar que la respuesta humoral (Harrus y col., 1999).

Para determinar la función del bazo en la patogénesis de la EMC, el efecto de la esplenectomía en el curso de la fase aguda fase de la enfermedad experimental fue investigado. La clínica y los hallazgos hematológicos del estudio indicaron que el proceso de la enfermedad fue considerablemente más leves en los perros esplenectomizados que en los perros intactos. No parece haber ninguna diferencia en el tiempo de aparición o en el título de anticuerpos específicos. Durante la fase aguda, el consumo de alimentos fue significativamente mayor en los esplenectomizados que en los intactos. Durante este período, se midió la temperatura corporal que resultó significativamente mayor en el grupo intacto en comparación con el grupo esplenectomizados. El hematocrito, recuento de eritrocitos, las concentraciones de hemoglobina, y plaquetas fueron significativamente mayores en los esplenectomizados que en los intactos durante todo el curso del estudio. El

bazo juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades inmunes, y en los casos refractarios, el tratamiento médico como la esplenectomía, puede estar indicada. La eliminación del órgano dominante de la producción de anticuerpos y la eliminación de la uno de los sitios más importantes del sistema fagocítico mononuclear se considera los principales objetivos alcanzados por la esplenectomía, debido a esto, se sugiere que el bazo juega un papel clave en la patogenia de la erliquiosis monocítica canina.

No hay vacuna eficaz para la erliquiosis monocítica canina, ni para otras erliquiosis. En una serie de inmunización los estudios que utilizan cultivos de células inactivadas derivadas de *Ehrlichia canis* de antígeno, fortificada por adyuvantes, fueron inducidos buenos niveles de anticuerpos. Sin embargo, cuando fueron desafiados los perros a la infección, la manifestación clínica de la enfermedad en los vacunados parecía más fulminante que en los perros no inmunizados (Harrus y col., 1999).

Patogenia

Una mejor comprensión de los mecanismos principales implicados en la patogénesis de la enfermedad puede ayudar a los médicos en la comprensión del proceso de la enfermedad y el adecuado tratamiento, que ofrezcan un mejor pronóstico para sus pacientes (Harrus y col., 1999).

Cada miembro del género *Ehrlichieae* tiene su propio tropismo celular de destino. La mayoría de las especies de *Ehrlichia* son monocitotropicas, entre las que están *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. sennetsu*, *E. risticii* y *E. Muris* (Mavromatis y col., 2006).

Durante la fase aguda, el parásito ingresa al torrente sanguíneo y linfático y se localiza en los macrófagos del sistema reticuloendotelial del bazo, hígado y ganglios linfáticos (Teng y col., 2003), donde se replica por fisión binaria. Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan a las *Ehrlichias* hacia otros órganos del cuerpo (Warner y Harrus, 2000).

Ehrlichia canis infecta predominantemente las células fagocíticas mononucleares (Branger y col., 2004; McBride y col., 2000). El período de incubación de la EMC va de 8 a 20 días (Branger y col., 2004; Felek, 2003a; Rikihisa y col., 1994b; Harrus y col., 1998a).

El hierro es una necesidad para la supervivencia de casi todos los procariotas y eucariotas. La necesidad de hierro ha sido demostrada al aumentar la virulencia de muchas bacterias patógenas diversas al tener una fuente ilimitada de hierro. La limitación de la disponibilidad de hierro libre es un mecanismo de medidas para suprimir el crecimiento natural de las bacterias. Bajo la presión selectiva de limitar hierro disponible en el huésped, las bacterias patógenas han evolucionado. Para la bacteria *Ehrlichia*, obligatoriamente intracelular, la vacuola citoplasmática donde reside la *Ehrlichia*, que puede promover la liberación de hierro libre en el compartimento (Doyle y col., 2005).

La trombocitopenia en la EMC se atribuye a los diferentes mecanismos en las diferentes etapas de la enfermedad. Mecanismos se cree que participan en la patogenia de la trombocitopenia en la fase aguda la fase de la enfermedad incluyen el aumento del consumo de plaquetas, debido a cambios inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos, de secuestro esplénico aumento de las plaquetas, e inmunológicos la destrucción o daño que resulte en una disminución significativa vida de la plaqueta (Harrus y col., 1999).

Con el desarrollo de la trombocitopenia durante la fase aguda, un aumento significativo en el volumen plaquetario medio y generalmente se observa y refleja trombopoyesis activos. En la fase crónica grave de la enfermedad, la disminución de la producción de plaquetas debido a la hipoplasia de la médula ósea se considera como la razón para la trombocitopenia (Harrus y col., 1999).

Estudios utilizando radioisótopos han demostrado que el tiempo de supervivencia de plaquetas disminuyó de una media de 9 días a 4 días, 2 a 4 días después de la infección con *E. canis* (Harrus y col., 1999).

La identificación de ADN de *Ehrlichia* en aspirados esplénicos, obtenidos de 4 portadores persistentes después de 34 meses de la infección experimental, sugiere que el bazo es el órgano donde permanece la *Ehrlichia* en los casos subclínicos. Se cree que los perros inmunocompetentes son capaces de eliminar al agente durante la fase subclínica. Algunos perros persistentemente infectados pueden desarrollar subsecuentemente la fase severa crónica de la enfermedad (Warner y Harrus, 2000).

La gravedad de la enfermedad depende del estado inmunológico del huésped (Vinasco y col., 2007).

Signos

La EMC tiene 3 presentaciones: aguda, subclínica y crónica (Rikihisa y col., 1992; Lopez y col., 2007; Mavromatis y col., 2006; Felek, 2003a; Schaefer y col., 2007).

En la fase aguda que dura de 2 a 4 semanas (Mcbride y col., 2001), se observan signos clínicos, tales como: fiebre (Rikihisa y col., 1992; Lopez y col., 2007; Gaunt y col., 1996), depresión, anorexia (Rikihisa y col., 1994a; Rikihisa y col., 1994b; Schaefer y col., 2007), linfadenomegalia (Rikihisa y col., 1992; Lopez y col., 2007; Felek, 2003a; Mcbride y col., 1999), disnea, pérdida de peso ligero (Rikihisa y col., 1992; Rikihisa y col., 1994b), ataxia (Schaefer y col., 2007) y proteinuria (Gaunt y col., 1996). Los signos oculares no son infrecuentes e incluyen uveítis anterior (Warner y Harrus, 2000). Algunos perros en fase aguda se presentan con signos inespecíficos, como letargo, esplenomegalia, vómito, diarrea, cojera, edema en las las piernas traseras, tos ó una secreción oculonasal serosa a purulenta (Schaefer y col., 2007). Los síntomas de trastornos de la coagulación como epistaxis leve, petequias y equimosis han sido reportados (Lopez y col., 2007; OIE, 2005), incluyendo la anemia (Schaefer y col., 2007; Vinasco y col., 2007; OIE, 2005). Los signos oculares pueden incluir uveítis anterior, opacidad corneal, hipema y vasos tortuosos de la retina (OIE, 2005).

Después de la fase aguda de la enfermedad, la infección por *E. canis*, puede persistir después de la recuperación clínica espontánea o tratamientos

inadecuados y esos animales pueden entrar en la fase subclínica de la EMC

(Harrus y col., 1999; Mavromatis y col., 2006; Cardenas y col., 2007).

En la fase subclínica, puede durar de 40 a 120 días (Unver y col., 2001b; Unver y col., 2001a; McBride y col., 1999). La ausencia de manifestaciones clínicas, se puede desarrollar y persistir por años en perros sin tratar o perros tratados inadecuadamente (Cardenas A. M., 2007; Mavromatis y col., 2006; McBride y col., 1999). Además, estos perros pueden desarrollar una enfermedad crónica grave, en el que el pronóstico es menos favorable y las muertes se producen por una infección secundaria y una hemorragia incontrolable (Cardenas y col., 2007).

Algunos perros puede caer directamente en una fase crónica grave de 6 a 12 semanas postinfección, en la fase crónica severa, puede haber deterioro de la producción de glóbulos asociada con hipoplasia de médula ósea, lo cual es irreversible, lo que resulta en un pronóstico menos favorable y posiblemente la muerte (Mavromatis y col., 2006).

La fase crónica es caracterizada por hemorragias (Cardenas y col., 2007; Hegarty y col., 1997; Rikihisa y col., 1994a; Schaefer y col., 2007), entre ellas epistaxis (Felek, 2003a), emaciación (McBride y col., 1999; Hegarty y col., 1997; Rikihisa y col., 1994a; Schaefer y col., 2007) hipotensión y choque (Felek, 2003a), lo que lleva a la muerte (Rikihisa y col., 1992; Felek., 2003a). Los signos comunes son debilidad, depresión, fiebre, anorexia, edema de las extremidades, la cola y el escroto (OIE, 2005). La uveítis anterior, la enfermedad de la retina y la ceguera se han reportado. Perros infectados crónicamente, también pueden desarrollar artritis (Hegarty y col., 1997; Unver y col., 2001a), insuficiencia renal, neumonía intersticial o polimiositis (OIE, 2005). Puede haber desprendimiento de retina y ceguera debido a hemorragias subretinales. Se pueden presentar otros signos clínicos como vómitos, descarga oculonasal serosa a purulenta, claudicación y ataxia (Warner y Harrus, 2000).

Una vez que los perros están infectados con *E. canis*, que puede permanecer infectado de por vida, incluso después de 1 año de tratamiento con doxiciclina (Felek, 2003a).

Algunos trastornos de la reproducción han sido reportados, incluyendo sangrado prolongado durante el estro, la incapacidad para concebir, el aborto y muerte neonatal (OIE, 2005). La fase crónica a menudo es agravada por una sobreinfección con otros organismos (Ohashi y col., 1998; Cardenas y col., 2007; Rikihisa y col., 1994b).

Los signos neurológicos se pueden ver ya sea durante la fase aguda o en la fase crónica (OIE, 2005), la muerte puede ocurrir como consecuencia de hemorragias o infecciones secundarias (Felek, 2003a; Mavromatis y col., 2006).

Lesiones

En la etapa aguda, las lesiones graves suelen ser inespecíficas. Los hallazgos más comunes incluyen esplenomegalia, linfadenopatía y pulmones pesados y/o descoloridos. Los casos graves de perros con erliquiosis monocítica se caracterizan por emaciación, palidez de mucosas, esplenomegalia y hemorragias en todo el tracto gastrointestinal, corazón, la vejiga, los pulmones, los tejidos subcutáneos y los ojos. Los ganglios linfáticos, en particular, los ganglios mesentéricos, pueden estar agrandados y con coloración marrón en la superficie de corte. Puede haber edema en las piernas, así como la ascitis y hidropericardio (OIE, 2005).

En la necropsia, esplenomegalia, adenopatías y plasmocitosis en varios órganos se encuentran en los animales infectados con *E. canis*. El mayor número de mórula se ven en macrófagos en los pulmones, el bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de perros infectados experimentalmente. Mediante microscopía electrónica, la *E. canis* se ve en los macrófagos alveolares de los pulmones de los perros infectados experimentalmente (Rikihisa, 1991b).

Diagnóstico

Varias pruebas serológicas están disponibles para el diagnóstico de erliquiosis monocítica canina (Allsopp M. T., 2001). Existe comercialmente una técnica

de diagnóstico que proporciona una forma precisa y práctica que puede hacerse en sólo ocho minutos, diagnosticada por medio de un análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Lopez y col., 2007; Belanger y col., 2002) con una detección exacta de al menos 98% de especificidad (Rikihisa y col., 1992).

Las anomalías hematológicas, como leucopenia (Rikihisa y col., 1992), trombocitopenia (Rikihisa y col., 1992; Gaunt y col., 1996; Rikihisa y col., 1994b; Vinasco y col., 2007) Y anemia (Rikihisa y col., 1994b; Vinasco y col., 2007) a menudo proporcionan evidencia útil de EMC y son factores importantes en el diagnóstico inicial (Mcbride y col., 2001).

Las anomalías bioquímicas principales incluyen hipergammaglobulinemia (Gaunt y col., 1996; Rikihisa y col., 1992; Scorpio y col., 2008) hipoalbuminemia, hiperglobulinemia (Harrus y col., 1999).

La pérdida de albúmina se debe al edema inflamatorio como resultado de la aumento de la permeabilidad vascular, la pérdida de sangre, o a la disminución de la producción de proteínas, debido a una enfermedad hepática leve concurrentes (Harrus y col., 1999).

Ya que la síntesis de albúmina se regula por la presión oncótica, la disminución de las concentraciones de albúmina puede actuar como una compensación mecanismo para el estado hiperglobulinémica, manteniendo así la presión oncótica y la prevención de un aumento en la sangre la viscosidad (Harrus y col., 1999).

Las concentraciones de gamma globulina aumentan durante el periodo febril, la fase de la erliquiosis canina y persisten durante la infección subclínica y la fase crónica de la enfermedad. Hay una pobre correlación entre las concentraciones de gamma globulina y específicas *E. canis*, los títulos de anticuerpos. La pobre correlación entre estos dos parámetros y la gammapatía policlonal registrados a ocurrir en la mayoría de los perros enfermos sugieren que la producción no específica de anticuerpos es inducida por *E. canis* y que los anticuerpos específicos no son la principal fuente de gammaglobulinas a contribuir a la hipergammaglobulinemia (Rikihisa, 1991b).

La trombocitopenia es considerada como la más común y la anormalidad hematológica coherente de los perros de forma natural o experimentalmente infectados con *E. canis* (Harrus y col., 1999).

El aislamiento del microorganismo es muy tardado (Inokuma y col., 2001), de 14 a 34 días (Wen y col., 1997) o 1 a 4 semanas (Allsopp y col., 2001), y sólo unos pocos laboratorios han mostrado sistemáticamente con éxito la infección con este método (Mcbride y col., 2001).

La erliquiosis a veces puede ser confirmado por la búsqueda de mórulas en frotis de sangre periférica (Rikihisa y col., 1992; Harrus y col., 2004; OIE, 2005), Sólo alrededor del 4% de los frotis de sangre para evaluar de perros con infección aguda de *E. canis* pueden ser positivos para mórula (Waner y col., 2000).

Reacción en cadena de la polimerasa ha sido empleado para detectar e identificar especies de *Ehrlichia* (Little y col., 1997). La sensibilidad y especificidad de PCR para la detección de la *Ehrlichia* probablemente superior al de frotis sanguíneo (Schouls y col., 1999).

La importancia de *E. canis* como un patógeno veterinario en conjunción con la identificación de *E. chaffeensis* como la causa de zoonosis emergentes transmitidas por garrapatas, ha destacado la necesidad de mejora de diagnóstico y vacunas de uso veterinario (Doyle y col., 2006).

Prevención Y Control

Hasta la fecha, no se ha desarrollado ninguna vacuna eficaz contra *E. canis* (Warner y Harrus, 2000; Felek, 2003a), el control de las garrapatas sigue siendo la medida de prevención más eficaz contra la infección. En áreas endémicas, el tratamiento con bajas dosis de oxitetraciclina (6,6 mg/kg) una vez al día ha sido sugerida como medida preventiva. Este método ha sido recientemente utilizado por la Armada Francesa en perros en Senegal y la Costa de Marfil, La tasa estimada de fracaso obtenida fue de 0,9 %. A pesar del éxito de este

tratamiento, los autores no consideran práctica esta medida debido a la posibilidad del desarrollo futuro de cepas de *E. canis* resistentes (IDEXX 2010).

Tratamiento

Las tetraciclinas han sido los fármacos de elección para el tratamiento de rickettsiosis (Schaefer y col., 2007). Sin embargo la doxiciclina oral se utiliza comúnmente para el tratamiento de la erliquiosis canina (Wen y col., 1997; Schaefer y col., 2007). La doxiciclina en la actualidad es el antibiótico de primera línea en el tratamiento de pacientes infectados con estos organismos (Branger y col., 2004; Harrus y col., 2004), en dosis de 10 mg/kg una vez por día ó 5 mg/kg dos veces por día, durante tres semanas como mínimo. Un tratamiento a corto plazo con doxiciclina a dosis de 10 mg/kg (Branger y col., 2004), una sola toma diaria durante 7 días no ha tenido buenos resultados (Breitschwerdt y col., 1998), mientras que la administración durante 10 días fue exitosa (Branger y col., 2004).

Al igual que con otros *Rickettsia*, *Ehrlichia spp.* son resistentes a los aminoglucósidos (Rikihisa, 1991b).

El diagnóstico de caninos en la primera etapa de la infección es importante para garantizar un tratamiento precoz y un buen pronóstico (Ohashi y col., 1998).

Los perros en la fase aguda de la enfermedad han de demostrar una mejora dramática hematológica y clínicamente en 24-48 horas después de recibir la terapia (Ohashi y col., 1998). Sin embargo, los perros en la fase crónica de la enfermedad tienen un pronóstico pobre y no puede mejorar empezando el tratamiento (Mcbride y col., 1996).

El modo de acción de la doxiciclina es la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. Doxiciclina difiere de las tetraciclinas, ya que tiene un alto grado de solubilidad en lípidos y es más completamente absorbido por el tracto gastrointestinal que la oxitetraciclina. Debido al alto grado de absorción y

de tasas de excreción lenta, doxiciclina tiene una larga vida media en suero, aproximadamente 19,5 h (Iqbal y Rikihisa, 1994).

El dipropionato de imidocarb a una dosis de 5 mg/Kg, una o dos inyecciones por vía IM con un intervalo de 14 días, puede ser usado conjuntamente con la doxiciclina (Warner y Harrus, 2000).

Los animales en la fase subclínica pueden necesitar un tratamiento más prolongado en comparación con los perros que sufren la etapa aguda (Branger y col., 2004).

Los antibióticos pueden ser menos eficaces en perros con signos neurológicos y el tratamiento de la forma crónica severa es difícil (OIE, 2005).

En algunos casos la infección puede persistir incluso después del tratamiento (Harrus y col., 1998a).

JUSTIFICACION

De acuerdo a los antecedentes descritos anteriormente y tomando en cuenta que no hay reportes que nos indiquen los signos mas frecuentes y la edad a la cual los animales son mas susceptibles a ser infectados por *E. canis* en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, se realizó el presente estudio con la finalidad de enlistar los signos clínicos más comunes de la enfermedad, así como conocer la edad de los caninos afectados y si tiene algún efecto con la frecuencia de presentación de la enfermedad.

En nuestro medio los clínicos veterinarios especialistas en pequeñas especies han observado con frecuencia la infección diagnosticada por medio de un análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), observando una alta frecuencia, sin embargo no está bien establecida la prevalencia e incidencia de la erliquiosis, por lo que esta investigación pretende establecer la presencia de *Ehrlichia canis* en el estado de Chihuahua.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Realizar un estudio retrospectivo para identificar la presencia de *Ehrlichia canis* en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, diagnosticada por medio de la técnica de ELISA

Objetivos Específicos.

Identificar los signos clínicos más comunes de la enfermedad debido a *Ehrlichia canis*.

Conocer a que edad los caninos son mas susceptibles a ser infectados por *Ehrlichia canis*.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron los archivos de un Hospital Veterinario ubicado en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, para identificar los casos en que se practicaron pruebas de ELISA para el diagnóstico de *E. canis* (Test Snap 4Dx y 3Dx de IDEXX). Se investigó la cantidad de caninos positivos a *E. canis* y se distribuyeron gráficamente de acuerdo a la edad y signos que presentaron.

Figura 2. Procedimiento de la prueba de ELISA practicada para el diagnóstico de *Ehrlichia canis*.

Figura 2a. Se pusieron 3 gotas de la muestra y 4 gotas de conjugado en un tubo de ensayo desechable.



Figura 2b. Se invirtió suavemente el tubo de muestra 4-5 veces para mezclar.



Figura 2c. Se vació todo el contenido en el SNAP, justo en donde se muestra en la figura.



Figura 2d. Cuando la sangre avanzó hasta el círculo pequeño y lo pintó totalmente, se presionó con fuerza la parte alta del SNAP, se escuchó un sonido especial.

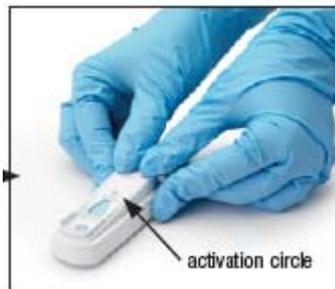
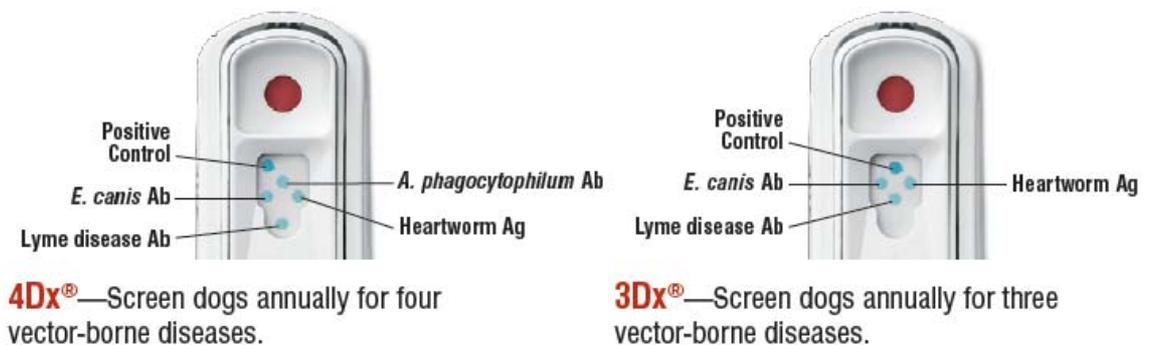


Figura 2e. Cuando el tiempo apropiado pasó, se dio lectura del resultado (cualquier tono azul se consideró como positivo).



Figura 2f. Indicadores de las distintas enfermedades y el control positivo.



RESULTADOS

El estudio retrospectivo se realizó con 967 pacientes que llegaron al Hospital Veterinario en la Cd. de Chihuahua, Chih., sospechosos y no sospechosos a erliquiosis, que tuvieron por lo menos una consulta en este hospital, 68 fueron positivos a *Ehrlichia canis* (7.03%).

Los resultados obtenidos de acuerdo a los signos clínicos observados en los animales analizados fueron muy variados, pero hubo cierta inclinación por 6 signos que fueron: fiebre (55.9%) epistaxis (19.1%), caquexia (16.2%), neumonía (13.2%), hematuria (10.3%) y artritis (8.8%), el cuadro 3 y la figura 3 muestran estos resultados.

Cuadro 3. Signos clínicos observados en los casos de estudio.

Signos	n (%)
Fiebre	38/68 (55.9%)
Hemorragias	28/68 (41.17%)
Epistaxis	13/68 (19.11%)
Melena	4/68 (5.88%)
Hematuria	7/68 (10.29)
Pioderma	4/68 (5.88%)
Caquexia	11/68 (16.17%)
Asintomáticos	5/68 (7.35%)
Queratitis	5/68 (7.35%)
Conjuntivitis	1/68 (1.47%)
Convulsión	3/68 (4.41%)
Anemia	3/68 (4.41%)
Ictericia	1/68 (1.47%)
Linfadenitis	1/68 (1.47%)
Escléra Congestionada	1/68 (1.47%)
Neumonía	9/68 (13.23%)
Artritis	6/68 (8.82%)

Cuadro 4. Edad de los perros positivos a *Ehrlichia canis*.

Edad (años)	n (%)
1	11/68 (16.18%)
2	9/68 (13.24%)
3	10/68 (14.70%)
4	13/68 (19.11%)
5	11/68 (16.17%)
6	2/68 (2.94%)
7	3/68 (4.41%)
8	2/68 (2.94%)
9	2/68 (2.94%)
10	3/68 (4.41%)
11	1/68 (1.48%)
12	0/68 (0%)
13	0/68 (0%)
14	0/68 (0%)
15	1/68 (1.48%)
	68 (100%)

La prevalencia en la presentación de esta enfermedad vario considerablemente conforme a nuestros resultados, teniendo más frecuencia de incidencia en los primeros 5 años de vida del canino, con un 79.4 % de los casos reportados, con una marcada disminución en la presentación después de estos 5 años.

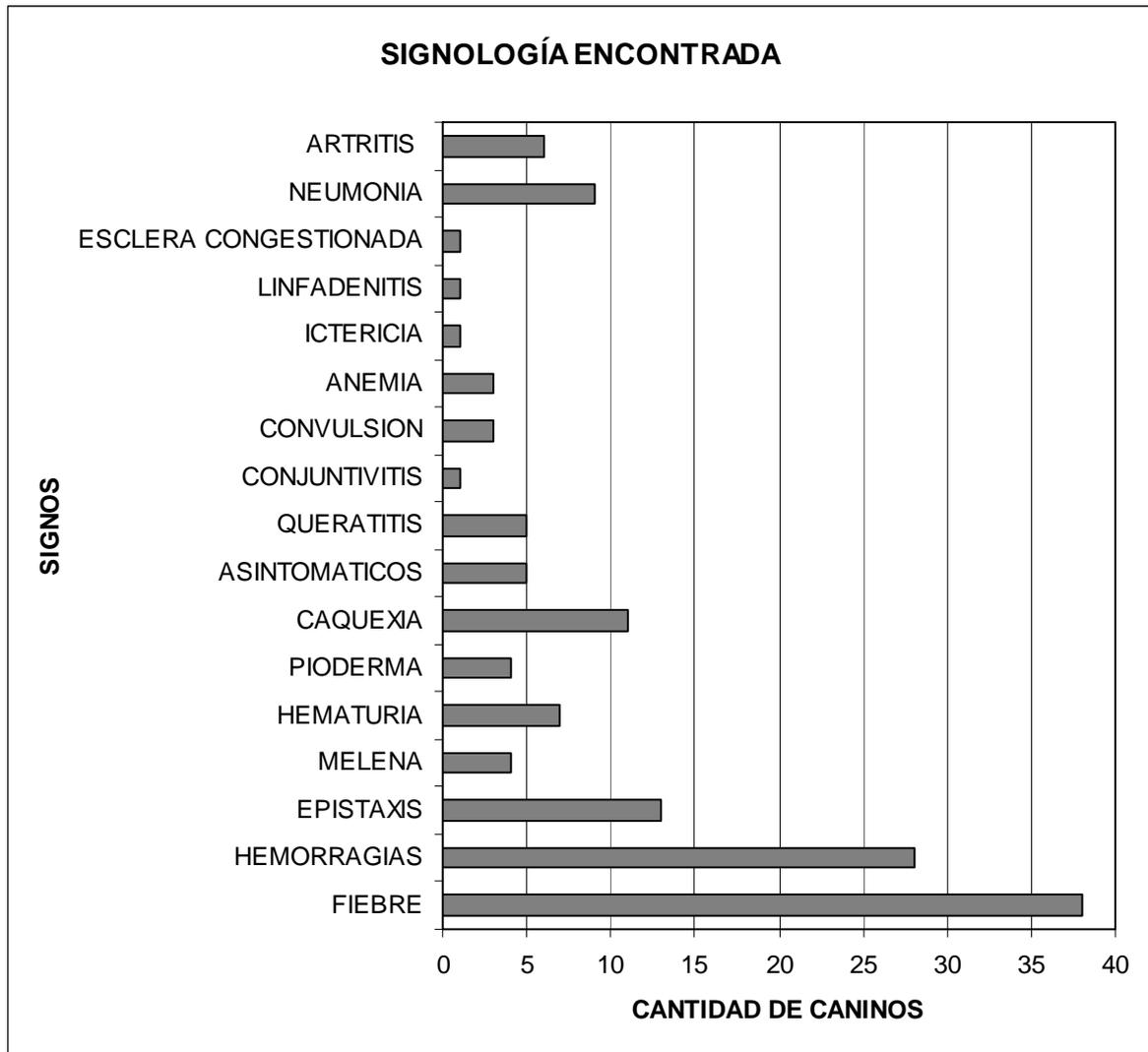


Figura 3. Signos clínicos observados en los casos de estudio.

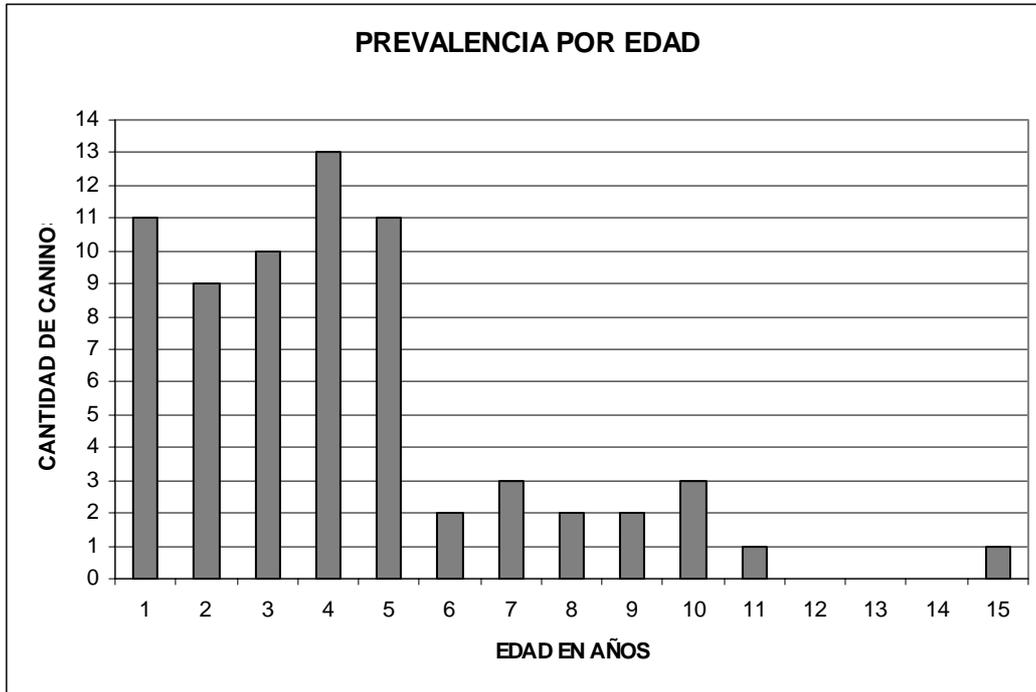


Figura 4. Animales positivos por edad en años.

DISCUSIÓN

En Suiza se examinaron 996 muestras por la técnica de inmunofluorescencia, para detectar anticuerpos de *Ehrlichia canis* y encontraron el 2.2 % de las muestras positivas (Pusterla y col., 1998). Por otra parte, en Australia se examinaron 316 muestras en las cuales se obtuvieron el 2.2% (Masón y col. 2001). En nuestro reporte se analizaron 976 animales enfermos, observándose una frecuencia de erliquiosis de 7.02%.

Lo encontrado en esta investigación, coincide con lo reportado por Lopez (2007) y Gaunt (1996) quienes observaron que la fiebre era un signo clínico muy común, coincide también con Rikihisa (1992) ya que también reportó la disnea y pérdida de peso; Lopez (2007), Cardenas (2007), Hegarty (1997), Rikihisa (1994^a), Schaefer (2007) y Felek (2003^a), hacen énfasis en la presentación de trastornos de la coagulación como epistaxis y hemorragias, Schaefer (2007) y Vinasco (2007) están apoyados por esta investigación con la presentación de anemia; Hegarty (1997) y Unver (2001^a) mencionan la presencia de artritis; en nuestros resultados se encontró neumonía como lo comunica el Organismo Internacional de Epizootias (OIE, 2005) y claudicación en infectados como lo afirman Warner y Harrus (2000).

El presente reporte hace mención de la presencia de hematuria (10.3%), melena (5.8%) que pueden clasificarse en los reportes con hemorragias debido a erliquiosis. Otras alteraciones observadas fueron el pioderma (5.8%), queratitis (7.3%), ictericia (1.4%), concomitantes a la infección por rickettsias y signos clínicos convulsivos (4.4%) que se puede asociar a la hipoxia por anemia.

En contradicción a los reportes de Harrus (1999) en los cuales la edad no tiene relevancia en cuanto a la frecuencia de presentación de la enfermedad, en nuestros resultados, los caninos parecen ser más susceptibles en los primeros 5 años de vida, siendo mucho menos susceptibles a partir del 6 año.

CONCLUSIÓN

Los signos que predominaron en los perros infectados por *E. canis* en la ciudad de Chihuahua, Chih., fueron: fiebre, epistaxis, caquexia, neumonía, hematuria y artritis. Hay algunos signos mas que se presentaron en los caninos, pero que su frecuencia fue menor en comparación con estos.

Según los resultados que se obtuvieron en este estudio y contradictorio a lo dicho en la revisión de literatura, la edad a la cual los caninos son mas susceptibles a infectarse en los primeros 5 años de vida, después del quinto año, la susceptibilidad es mucho menor.

Se recomienda investigar más a fondo sobre esta enfermedad, ya que hay puntos en los que no se ha profundizado, como es el caso del porque la edad interfiere en la susceptibilidad o frecuencia de presentación.

LITERATURA CITADA

- Alleman A.R., M.L.J., Barbet A.F., Breitschwerdt E.B., Sorenson H. L., Bowie M.V., Belanger M., 2001, Recombinant Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis*: a Potential Diagnostic Tool. *Journal Of Clinical Microbiology* 39, 2494-2499.
- Allsopp M. T., A.B.A., 2001, Novel *Ehrlichia* Genotype Detected in Dogs in South Africa. *Journal Of Clinical Microbiology* 39, 4204-4207.
- Belanger M., S.H.L., France M. K., Bowie M. V., Barbet A. F., Breitschwerdt E.B., Alleman A.R., 2002, Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infections in Dogs. *Journal Of Clinical Microbiology* 40, 3506-3508.
- Bitsaktsis C., N.B., Racine R., MacNamara K. C., Winslow G., 2007, T-Cell-Independent Humoral Immunity Is Sufficient for Protection against Fatal Intracellular *Ehrlichia* Infection. *Infection And Immunity* 75, 4933-4941.
- Branger S., R.J.M., Raoult D., 2004, Evaluation of Antibiotic Susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by Real-Time PCR. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 48, 4822-4828.
- Breitschwerdt E. B., H.B.C., Hancock S. I., 1998, Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two *Ehrlichia canis* Strains. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 42, 362-368.
- Breitschwerdt E.B., H.B.C., Hancock S.I., 1998, Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *Journal Of Clinical Microbiology* 36, 2645-2651.
- Brouqui P., B.M.L., Raoult D., 1994, Cytopathic Effect, Plaque Formation, and Lysis of *Ehrlichia chaffeensis* Grown on Continuous Cell Lines. *Infection And Immunity* 62, 405-411.
- Brouqui P., D.J.S., Raoult D., Walker D.H., 1992, Antigenic Characterization of Ehrlichiae: Protein Immunoblotting of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia risticii*. *Journal Of Clinical Microbiology* 30, 1062-1066.
- Cardenas A. M., D.C.K., Zhang X., Nethery K., Corstvet R.E., Walker D.H., McBride J.W., 2007, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Conserved Immunoreactive Glycoproteins gp36 and gp19 Has Enhanced Sensitivity and Provides Species-Specific Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection. *Clinical And Vaccine Immunology* 14, 123-128.
- Chen S., D.J.S., Bakken J.S., Walker D.H., 1994, Identification of a Granulocytotropic *Ehrlichia* Species as the Etiologic Agent of Human Disease. *Journal Of Clinical Microbiology* 32, 589-595.
- Doyle C. K., Z.X., Popov V. L., McBride J. W., 2005, An Immunoreactive 38-Kilodalton Protein of *Ehrlichia canis* Shares Structural Homology and Iron-Binding Capacity with the Ferric Ion-Binding Protein Family. *Infection And Immunity* 73, 62-69.
- Doyle C.K., N.K.A., Popov V.L., W. McBride J.W., 2006, Differentially Expressed and Secreted Major Immunoreactive Protein Orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* Elicit Early Antibody Responses to

- Epitopes on Glycosylated Tandem Repeats. *Infection And Immunity* 74, 711-720.
- Felek S., G.R., Rikihisa Y., 2003a, Transcriptional Analysis of p30 Major Outer Membrane Protein Genes of *Ehrlichia canis* in Naturally Infected Ticks and Sequence Analysis of p30-10 of *E. canis* from Diverse Geographic Regions. *Journal Of Clinical Microbiology* 41, 886-888.
- Felek S., H.H., Rikihisa Y., 2003b, Sequence and Expression Analysis of virB9 of the Type IV Secretion System of *Ehrlichia canis* Strains in Ticks, Dogs, and Cultured Cells. *Infection And Immunity* 71, 6063-6067.
- Gaunt S.D., C.R.E., Berry C. M., Brennan B., 1996, Isolation of *Ehrlichia canis* from Dogs following Subcutaneous Inoculation. *Journal Of Clinical Microbiology* 34, 1429-1432.
- Harrus S., K.M., Miara L, Aizenberg I., Waner T., Shaw A., 2004, Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment of Experimental *Ehrlichia canis* Infection. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 48, 4488-4490.
- Harrus S., W.T., Aizenberg I., Bark H., 1998a, Therapeutic Effect of Doxycycline in Experimental Subclinical Canine Monocytic Ehrlichiosis: Evaluation of a 6-Week Course. *Journal Of Clinical Microbiology* 36, 2140-2142.
- Harrus S., W.T., Aizenberg I., Foley J. E., Poland A. M., Bark H., 1998b, Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. *Journal Of Clinical Microbiology* 36, 73-76.
- Harrus S., W.T., Bark H., Jongejan F., Cornelissen A. W., 1999, Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal Of Clinical Microbiology* 37, 2745-2749.
- Hegarty B.C., L.M.G., Gager R.F., Breitschwerdt E.B., 1997, Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigations* 9, 32-38.
- Hildebrandt P. K., C.J.D., Mckee I. A. E., Nyindo M. B. A., Huxsoll D. L., 1973, Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infection And Immunity* 7, 265-271.
- Inokuma H., B.P., Drancourt M., Raoult. D., 2001, Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of *Ehrlichia*. *Journal Of Clinical Microbiology* 39, 3031-3039.
- Iqbal Z., R.Y., 1994, Reisolation of *Ehrlichia canis* from Blood and Tissues of Dogs after Doxycycline Treatment. *Journal Of Clinical Microbiology* 32, 1644-1649.
- Kakoma I., H.R.D., Anderson B.E., Hanley T.A., Sims K.G., Liu L., Bellamy C., Long M.T., Baek B.K., 1994, Cultural, Molecular, and Immunological Characterization of the Etiologic Agent for Atypical Canine Ehrlichiosis. *Journal Of Clinical Microbiology* 32, 170-175.
- Keysary A., W.T., Strenger C., Harrus S., 2001, Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 521-523.
- Knowles T.T., A.A.R., Sorenson H.L., Marciano D.C., Breitschwerdt E.B., Harrus S., Barbet A.F., Be' langer M., 2003, Characterization of the Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and Its Application for Serodiagnosis of Ehrlichiosis. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology* 10, 520-524.

- Little S.E., D.J.E., Lockhart J.M., Stallknecht D.E., Warner C.K., Davidson W.R., 1997, Development And Use Of Specific Polymerase Reaction For The Detection Of An Organism Resembling Ehrlichia Sp. In White-Tailed Deer. *Journal Of Wildlife Diseases* 33, 246-253.
- Lopez L., V.A., Aguirre E., García M., Rodriguez M., Tegui I., Tesouro M. A., Vela C., Sainz A., Rueda P. , 2007, Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against Ehrlichia canis. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 635-642.
- Luo t., Z.x., McBride j.w., 2009, Major Species-Specific Antibody Epitopes of the Ehrlichia chaffeensis p120 and E. canis p140 Orthologs in Surface-Exposed Tandem Repeat Regions. *Clinical And Vaccine Immunology* 16, 982-990.
- Magnarelli L.A., A.J.F., 1993, Serologic Evidence of Canine and Equine Ehrlichiosis in Northeastern United States. *Journal Of Clinical Microbiology* 31, 2857-2860.
- Magnarelli L.A., L.H.J., Holland C.J., Anderson J.F., Ristic M., 1990, Canine Ehrlichiosis in Connecticut. *Journal Of Clinical Microbiology* 28, 366- 367.
- Marsilio F., D.M.B., Meridiani I., Bianciardi P., 2006, Direct identification of Ehrlichia canis by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (glcA) gene from various Italian strains. *Journal Of Veterinary Diagnostic investigation* 18, 215-217.
- Mathew J. S., E.S.A., Malayer J. R., Fox J.C., Kocan K. M., 2000, Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of Ehrlichia canis infection. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 456-459.
- Mavromatis K., D.C.K., Lykidis A., Ivanova N., Francino M. P., Chain P., Shin P., Malfatti S., Larimer F., Copeland A., Detter J.C., Land M., Richardson P.M., Yu X.J., Walker D.H., McBride J.W., Kyripides N. C., 2006, The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium Ehrlichia canis Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal Of Bacteriology* 188, 4015-4023.
- Mcbride J. W., C.R.E., Breitschwerdt E. B., David H. Walker, 2001, Immunodiagnosis of Ehrlichia canis Infection with Recombinant Proteins. *Journal Of Clinical Microbiology* 39, 315-322.
- McBride J. W., C.R.E., Gaunt S. D., Chinsangaram S., Akita G. Y., Osburn B. I., 1996, PCR detection of acute Ehrlichia canis infection in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8, 441-447.
- McBride J. W., D.C.K., Zhang X., Cardenas A. M., Popov V. L., Nethery K. A., Woods M. E., 2007, Identification of a Glycosylated Ehrlichia canis 19-Kilodalton Major Immunoreactive Protein with a Species-Specific Serine-Rich Glycopeptide Epitope. *Infection And Immunity* 75, 74-82.
- Mcbride J. W., Y.X., Walker D. H., 2000, Glycosylation of Homologous Immunodominant Proteins of Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia canis. *Infection And Immunity* 68, 13-18.
- Mcbride J.W., Y.X., Walker D. H., 1999, Molecular Cloning of the Gene for a Conserved Major Immunoreactive 28-Kilodalton Protein of Ehrlichia canis: a Potential Serodiagnostic Antigen. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology* 6, 392-399.

- Nethery K.A., D.C.K., Zhang X., McBride J.W., 2007, Ehrlichia canis gp200 Contains Dominant Species-Specific Antibody Epitopes in Terminal Acidic Domains. *Infection And Immunity* 75, 4900-4908.
- Nicholson W.L., M.S., Sumner J.W., Childs J.E., 1998, Serologic Evidence of Infection with Ehrlichia spp. in Wild Rodents(Muridae: Sigmodontinae) in the United States. *Journal Of Clinical Microbiology* 36, 695-700.
- Ohashi N., R.Y., Unver A., 2001, Analysis of Transcriptionally Active Gene Clusters of Major Outer Membrane Protein Multigene Family in Ehrlichia canis and E. chaffeensis. *Infection And Immunity* 69, 2083-2081.
- Ohashi N., U.A., Zhi N., Rikihisa Y., 1998, Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major Outer Membrane Proteins of Ehrlichia canis and Application of the Recombinant Protein for Serodiagnosis. *Journal Of Clinical Microbiology* 36, 2671-2680.
- Parola P., C.J., Sanogo Y. O., Miller R.S., Thien H.V., Gonzalez J. P., Raoult D., Telford III S., Wongsrichanalai C., 2003, Detection of Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., and Other Eubacteria in Ticks from the Thai-Myanmar Border and Vietnam. *Journal Of Clinical Microbiology* 41, 1600-1608.
- Perez M., R.Y., Wen B., 1996, Ehrlichia canis-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela:Antigenic and Genetic Characterization. *Journal Of Clinical Microbiology* 34, 2133-2139.
- Popov V.L., H.V.C., Chen S.M., Dumler J.S., Feng H.M., Andreadis T.J., Tesh R.B., Walker D.H., 1998, Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus Ehrlichia. *Journal Of Medical Microbiology* 47, 235-251.
- Pusterla N., C.C., Chomel B. B., Chae J., Foley J. E., DeRock E., Kramer V. L., Lutz H., Madigan J. E., 2000, Serologic And Molecular Evidence Of Ehrlichia Spp. In Coyotes In California. *Journal of Wildlife Diseases* 36, 494-499.
- Pusterla N., P.J.B., Deplazes P., Wolfensberger C., Müller W., Ho"Rauf A., Reusch C., Lutz H., 1998, Seroprevalence of Ehrlichia canis and of Canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. *Journal Of Clinical Microbiology* 36, 3460-3462.
- Rikihisa, Y., 1991a, Cross-Reacting Antigens between Neorickettsia helminthoeca and Ehrlichia Species, Shown by Immunofluorescence and Western Immunoblotting. *Journal Of Clinical Microbiology* 29, 2024-2029.
- Rikihisa, Y., 1991b, The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 286-308.
- Rikihisa Y., E.S.A., Fox J. C., Siregar A. G., Pasaribu F. H., Malole M. B., 1992, Analyses of Ehrlichia canis and a Canine Granulocytic Ehrlichia Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 143-148.
- Rikihisa Y., E.S.A., Fox J.C., 1994a, Western Immunoblot Analysis of Ehrlichia chaffeensis, E. canis, or E. ewingii Infections in Dogs and Humans. *Journal Of Clinical Microbiology* 32, 2107-2112.
- Rikihisa Y., Y.S., Kwak I., Iqbal Z., Kociba G., Mott J., Chichanasiriwithaya W., 1994b, C-Reactive Protein and al-Acid Glycoprotein Levels in Dogs Infected with Ehrlichia canis. *Journal Of Clinical Microbiology* 32, 912-917.
- Scorpio D. G., W.L.M., Tunin R.S., Barat N. C., Garyu J. W., Dumler J.S., 2008, Retrospective Clinical and Molecular Analysis of Conditioned Laboratory

- Dogs (*Canis familiaris*) with Serologic Reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 47, 23-28.
- Schaefer J. J., N.G.R., Bremer W.G., Rikihisa Y., Ewing S. A., Stich R.W., 2007, Tick Acquisition of *Ehrlichia canis* from Dogs Treated with Doxycycline Hyclate. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 51, 3394-3396.
- Schouls L.M., V.D.P.I., Rijpkema S.G.T., Schot C.S., 1999, Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Senu Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *Journal Of Clinical Microbiology* 37, 2215-2222.
- Shankarappa B., D.S.S., Mattingly-Napier B. L., 1992, Antigenic and Genomic Relatedness among *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia canis*. *International Journal Of Systematic Bacteriology* 42, 127-132.
- Stich R. W., R.Y., Ewing S. A., Needham G.R., Grover D. L., Jittapalapong S., 2002, Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally Infected Ticks with a p30-Based PCR Assay. *Journal Of Clinical Microbiology* 40, 540-546.
- Teng C., P.R.U., Chang Y., 2003, Cloning and Characterization of an *Ehrlichia canis* Gene Encoding a Protein Localized to the Morula Membrane. *Infection And Immunity* 71, 2218-2225.
- Unver A., O.N., Tajima T., Stich R. W., Grover D., Rikihisa Y., 2001a, Transcriptional Analysis of p30 Major Outer Membrane Multigene Family of *Ehrlichia canis* in Dogs, Ticks, and Cell Culture at Different Temperatures. *Infection And Immunity* 69, 6172-6178.
- Unver A., P.M., Orellana N., Huang H., 2001b, Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. *Journal Of Clinical Microbiology* 39, 2788-2793.
- Unver A., R.Y., Ohashi N., Cullman L. C., Buller R., Storch G. A. , 1999, Western and Dot Blotting Analyses of *Ehrlichia chaffeensis* Indirect Fluorescent-Antibody Assay-Positive and -Negative Human Sera by Using Native and Recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* Antigens. *Journal Of Clinical Microbiology* 37, 3888-3895.
- Vinasco J., L.O., Alvarado A., Diaz D., Hoyos L., Tabachi L., Sirigireddy K., Ferguson C., Moro M.H., 2007, Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. *Journal Of Clinical Microbiology* 45, 2716-2719.
- Waner T., S.C., Keysary A., 2000, Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 240-244.
- Waner T., Harrus S., "Ehrlichiosis monocítica canina" (en línea), 13 Abril 2000, Enero 2010, Disponible en la Web: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Car michael/waner_es/ivis.pdf.
- OIE, "Ehrlichiosis" (en línea), 1 Mayo 2005, Enero 2010, Disponible en la Web: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>.
- Idexx Laboratories, "SNAP 4Dx Test" (en línea), 2010, Febrero 2010, Disponible en la Web: http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/smallanimal/inhouse/snap/4dx.jsf?selectedTab=Benefits.

- Wen B., R.Y., Mott J. M., Greene R., Kim H., Zhi N., Couto G. C., Unver A., Bartsch R., 1997, Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of Ehrlichia canis Infection in Dogs Treated with Doxycycline. Journal Of Clinical Microbiology 35, 1852-1855.
- Zhang X., L.T., Keysary A., Baneth G., Miyashiro S., Strenger C., Waner T., McBride J.W., 2008, Genetic and Antigenic Diversities of Major Immunoreactive Proteins in Globally Distributed Ehrlichia canis Strains. Clinical And Vaccine Immunology 15, 1080-1088.