



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

Plan de trabajo

Título: Comparación de métodos moleculares y serológicos para el diagnóstico de ehrlichiosis monocítica canina

Autor: Paula Lorena Martín

Director: María Sandra Arauz

Codirector: Gabriel L. Cicuttin

Índice

Resumen	3
Introducción	4
Etiología	4
Epidemiología.....	6
Patogenia y signos clínicos	9
Diagnóstico	10
Tratamiento y prevención	13
Hipótesis y objetivos	14
Metodología	14
Muestreo	15
Diagnóstico serológico	16
Diagnóstico molecular	17
Análisis estadístico	17
Resultados.....	18
Discusión y conclusiones	19
Bibliografía.....	22

Resumen

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos suponen un desafío para el veterinario debido a la presentación clínica inespecífica, la presencia de infecciones subclínicas y la co-infección de agentes infecciosos. La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad infecciosa transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato con distribución mundial causada por *Ehrlichia canis*, que puede producir una enfermedad severa cuando no es diagnosticada y tratada en forma temprana. El diagnóstico presuntivo de EMC se establece mediante los hallazgos epidemiológicos, signos clínicos y alteraciones hematológicas y bioquímicas compatibles. La confirmación de la enfermedad se realiza en forma directa mediante la detección del agente en extendidos sanguíneos o su ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa o indirectamente por métodos serológicos demostrando la presencia de anticuerpos específicos con un título mínimo de corte o seroconversión.

El objetivo de este estudio fue comparar el método serológico basado en la inmunocromatografía y la técnica de PCR para el diagnóstico *E. canis* en caninos sospechosos de Ciudad Autónoma de Buenos Aires y del sur del Gran Buenos Aires. Se utilizaron muestras de sangre con anticoagulante EDTA de animales con diagnóstico clínico presuntivo de EMC y de caninos clínicamente sanos. El diagnóstico serológico se realizó mediante la prueba inmunocromatográfica SPEED® EHRLI (BVT, Francia). Para la detección molecular se utilizó una PCR de tamizaje que amplifica un fragmento de 345 pb del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr de la familia Anaplasmataceae. Las muestras positivas se procesaron posteriormente mediante una PCR anidada específica de *E. canis*.

En el grupo de caninos clínicamente sanos no se detectó la presencia de *E. canis* mediante PCR ni anticuerpos específicos con la prueba inmunocromatográfica. En el grupo donde inicialmente se había solicitado la serología (2 y 3) la concordancia entre las pruebas fue escasa (0,200 95% IC -0.021- 0.421) mientras que en el grupo donde la prueba inicialmente solicitada fue la técnica de PCR la concordancia entre las pruebas fue adecuada (kappa: 0,650 95% IC 0.340-0.960). La concordancia entre las pruebas

evaluadas en el total de la población estudiada fue moderada (κ 0,496, IC 95% 0,311-0,682).

En conclusión, los resultados de nuestro estudio sugieren que la utilización de pruebas serológicas rápidas inicialmente, junto con la posterior confirmación mediante PCR permitirán mejorar el diagnóstico de la EMC.

Introducción

Etiología

La ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad bacteriana transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato de distribución mundial causada por *Ehrlichia canis*, un organismo intracelular obligado perteneciente al género *Ehrlichia* (familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiales). Los organismos de este género son bacterias gramnegativas, con forma de cocobacilos que miden alrededor de 0,5 μ m de diámetro, aerobias, se colorean con la tinción de Giemsa y crecen en líneas celulares de mamíferos. En el hospedador vertebrado, invaden las células sanguíneas de la serie leucocítica (monocitos) y se presentan en el interior del citoplasma en grupos de organismos llamados mórulas (Dumler y col., 2001).

Además, los caninos pueden contraer la infección con otras especies del género como *Ehrlichia chaffeensis*, que se detecta en el citoplasma de monocitos y *Ehrlichia ewingii*, la cual se observa en el citoplasma de leucocitos neutrófilos. Asimismo, dentro la familia Anaplasmataceae, otros organismos son patógenos para los caninos como *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Neorickettsia helminthoeca* (Dumler y col., 2001; Nair y col., 2016). La distribución de estos agentes varía considerablemente en distintas partes del mundo. Asimismo, los caninos infectados muestran una amplia variedad de signos clínicos o en ocasiones infecciones subclínicas persistentes dependiendo del agente involucrado. Los aspectos más importantes de las enfermedades que producen se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* que causan infección natural en caninos

Agente etiológico (enfermedad)	Distribución geográfica	Células infectadas	Vector	Hospedadores	Reservorios
<i>Ehrlichia canis</i> (ehrlichiosis monocítica canina)	Mundial	Monocitos y macrófagos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , sensu lato <i>Dermacentor variabilis</i> (experimental)	Cánidos	Cánidos domésticos y silvestres
<i>E. canis</i> cepa Venezuela (ehrlichiosis venezolana)	Venezuela	Monocitos y macrófagos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	Humanos y caninos	Incierto
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> (ehrlichiosis monocítica humana y canina)	Estados Unidos	Monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>A. testudinarium</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Haemaphysalis yeni</i> , <i>H. flava</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Humanos, caninos, caprinos, lemures	Venado de cola blanca, coyotes, zarigüeya, mapache, ratón de campo
<i>Ehrlichia ruminantum</i> (Cowdriosis o Hidropericarditis)	África	Endotelio, monocitos, macrófagos, neutrófilos,	<i>Amblyomma hebraeum</i>	Bovinos, caprinos, ovinos, caninos	Ungulados silvestres
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Estados Unidos	Granulocitos	<i>Amblyomma americanum</i>	Humanos, caninos	Caninos
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Hemisferio norte	Granulocitos	<i>Ixodes</i> spp.	Caninos, felinos, humanos, equinos, rumiantes	Venado de cola blanca, ratón silvestre, aves migratorias, ratón de campo, ardilla
<i>Anaplasma platys</i>	Mundial	Plaquetas	Garrapatas, otros	Caninos	Caninos,

Adaptado de Harrus S, Waner P, Mark Neer T (2012). Ehrlichia and Anaplasma Infections in Greene. Infectious diseases of the dog and cat. Fourth edition p 228.

Epidemiología

Los hospedadores de *E. canis* incluyen cánidos tanto salvajes como domésticos (Cardoso y col., 2015). Recientemente, se han descrito infecciones con *E. canis* en felinos domésticos y un supuesto caso humano por la técnica de PCR en México (Silva y col., 2010; Hegarty y col., 2015).

La transmisión de *E. canis* a caninos susceptibles ocurre principalmente por la picadura de garrapatas *R. sanguineus* s.l. Las transfusiones de sangre infectada con *E. canis* pueden también transmitir la enfermedad (Bremer y col., 2005). Algunos autores han sugerido la vía transplacentaria como otra forma de transmisión, sin embargo en un estudio reciente, ninguno de los cachorros analizados fue positivo, aún cuando sus madres presentaron infección activa y altos títulos anticuerpos (de Almeida y col., 2010; Taques y col., 2016).

El modo de transmisión en la garrapata es transestadial, donde la infección se transmite a los siguientes estadíos, pero no a la siguiente generación (forma transovárica). Las garrapatas adquieren la infección como larvas o ninfas al alimentarse de caninos infectados con *E. canis* y pueden transmitir la infección a animales susceptibles hasta por 155 días.

Rhipicephalus sanguineus s. l. es un complejo de especies con distribución mundial e importancia sanitaria animal y humana, dado que transmite numerosos agentes patógenos (Otranto y col., 2009). En América, se han identificado al menos dos linajes de *R. sanguineus* s.l.: tropical y templado, con diferente competencia vectorial para la transmisión de *E. canis* (en forma experimental) (Moraes Filho y col., 2015). El linaje tropical tiene distribución en áreas tropicales del norte de Argentina hasta el sur de EEUU y se encuentra relacionado con *R. sanguineus* presentes en África. Por otra parte, el linaje templado está asociado a climas templados y fríos del resto de Argentina, Chile, Uruguay y Norteamérica, y se encuentra relacionado con *R. sanguineus* de Europa occidental (Moraes Filho y col., 2015; Nava y col., 2012). En Argentina, especímenes de *R.*

sanguineus del linaje tropical se han encontrado naturalmente infectadas con *E. canis* en Formosa mientras que en especímenes de *R. sanguineus* del linaje templado de Salta, Corrientes, Chaco, Misiones y Ciudad Autónoma de Buenos Aires no fue hallada (Cicuttin y col., 2015; Oscherov y col., 2011).

Situación en el cono sur de Sudamérica

La prevalencia de EMC en el cono sur de Sudamérica varía ampliamente de acuerdo a la presencia de animales infectados que actúen como fuente de infección así como de la existencia de vectores competentes que puedan transmitir con éxito la misma. Asimismo, factores como la población de caninos estudiada y el método diagnóstico utilizado influyen en el valor de esta medida de frecuencia (Harrus y col., 1998; Vieira y col., 2011).

En Brasil, *E. canis* ha sido detectada en la mayoría de las regiones investigadas, con la excepción del estado de Rio Grande do Sul (Moraes-Filho y col., 2015). En Ituberá (Bahía), Guedes y col., (2015) obtuvieron una seroprevalencia con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) del 32,7 % sobre un total de 379 caninos sanos. Mientras que da Costa y col. (2015) en el estado de Maranhão obtuvieron una prevalencia de 14, 6% (47/322) y 2,8 % (9/322) en caninos de regiones urbanas y rurales con la técnica de IFI y PCR anidada respectivamente. Por el contrario, Lasta y col., (2013) en Porto Alegre obtuvieron resultados negativos mediante serología y PCR para *E. canis* luego de estudiar 196 caninos sin signología clínica.

En Chile, la ehrlichiosis canina se reportó por primera vez en Puente Alto en el año 1999; siendo inicialmente atribuida a *E. canis* por estudios serológicos (Lopez y col., 1999). Posteriormente se reportó un caso confirmado por técnicas moleculares, ocurrido en un perro de la ciudad de Arica (Lopez y col., 2012). Mientras que en la Región Metropolitana de este país, estudios moleculares posteriores realizados en caninos sintomáticos demostraron la presencia de *A. platys*, sin encontrarse infecciones por *E. canis* (Abarca y col., 2007).

En Uruguay, hasta la fecha no se han reportado datos sobre la EMC en muestras de caninos sospechosos; además, Venzal y col. (2007) en un estudio realizado a partir del vector no detectaron la presencia de ADN de *E. canis* en ninguna de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. estudiadas.

En Bolivia, un estudio llevado a cabo en el Parque Nacional Noël Kempff Mercado, demostró que un 86 % de caninos de un total de 22 mostraron anticuerpos para *E. canis* mediante la técnica de IFI. Sin embargo, los autores no descartan la posibilidad de resultados falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otros agentes del mismo género (Bronson y col., 2008).

En Argentina, pocos estudios han confirmado la presencia de este agente. En orden cronológico, Oscherov y col. (2011) en la provincia de Corrientes demostraron la presencia de *A. platys*, pero no *E. canis* luego de estudiar garrapatas *R. sanguineus* s.l. Eiras y col. (2013) analizaron por PCR muestras de caninos enviadas para análisis hematológicos y seleccionadas de acuerdo a la presencia de estructuras compatibles con mórulas, presencia de monocitos activados y recuento de plaquetas. De un total de 86 muestras analizadas 24 fueron positivas para familia Anaplasmataceae, aunque sólo 6 de 24 muestras fueron positivas para *E. canis* confirmadas posteriormente por secuenciación.

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Cicuttin y col. (2014a) hallaron 13.8% de positivos por PCR a *A. platys* en muestras sanguíneas de caninos clínicamente sanos, pero todos los caninos y garrapatas *R. sanguineus* s.l. analizadas resultaron negativos para *E. canis*. De igual manera, un estudio llevado a cabo en Bahía Blanca demostró la presencia de *A. platys* en el 37,5% de las muestras caninas de caninos clínicamente sanos, no siendo detectada *E. canis* ni en caninos ni en garrapatas *R. sanguineus* s.l. (Cicuttin y col., 2014b).

En 2015, Cicuttin y col. (2015) confirmaron la presencia de *E. canis* en tres adultos del grupo *R. sanguineus* pertenecientes al linaje tropical colectados en la provincia de Formosa. Mientras que en la provincia de Salta dos ninfas fueron positivas para *A. platys*. En todas las muestras de garrapatas estudiadas pertenecientes al linaje templado se obtuvieron resultados negativos para la detección de *E. canis*.

Recientemente, un estudio llevado a cabo en garrapatas y muestras sanguíneas de caninos positivos a *Hepatozoon* sp. reveló la presencia de *A. platys*, pero no *E. canis* en Mendoza (Cicuttin, comunicación personal). Finalmente, en muestras de caninos con sintomatología compatible con EMC del Área Metropolitana de Buenos Aires (CABA y municipios del Gran Buenos Aires) se detectó una prevalencia con la técnica de PCR de 13,4 % positivos para la familia Anaplasmataceae, siendo el 6,7 % positivos a *E. canis* (Cicuttin y col., 2016). Mientras que, en las provincias de Córdoba y Santa Fe, Mascarelli

y col. (2017) evaluaron 70 caninos clínicamente sanos y demostraron la presencia de ADN de *A. platys* en 11 animales (15,7%) pero no de *E. canis*.

Por otra parte, los estudios serológicos publicados en nuestro país son más escasos. Mediante la técnica serológica Speed-Ehrli se encontró que el 46.6% de los caninos con signología compatible fueron positivos para *E. canis* en un estudio llevado a cabo en la provincia de Mendoza (Mera y Sierra y Neira, 2014).

Patogenia

La EMC incluye un período de incubación de 8 a 20 días, seguido de una fase aguda, subclínica y a veces crónica. Durante la fase aguda, *E. canis* ingresa al torrente sanguíneo y linfático, y se localiza en los macrófagos del sistema retículo-endotelial del bazo, hígado y ganglios linfáticos, donde se replica por fisión binaria. Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan al microorganismo hacia otros órganos del cuerpo (Harrus y col., 2012).

Signos clínicos

La EMC constituye un desorden multisistémico que puede presentarse en forma clínica o subclínica. A su vez, la enfermedad clínica puede cursar en forma aguda o crónica y manifestarse con una amplia variedad de signos clínicos dependiendo de diversos factores tales como virulencia de la cepa de *E. canis*, infecciones concomitantes con otras enfermedades transmitidas por vectores, raza y estado inmunitario del animal (Klag y col., 1991; Unvera y col., 2009; Rotondano y col., 2015). No hay predilección sexual ni de edad y todas las razas pueden ser infectadas, aunque el Ovejero Alemán parece ser el más predispuesto a desarrollar EMC clínica (Harrus y col., 2012; Neer y col., 2002).

La fase aguda de la EMC se extiende 1-2 semanas y los signos clínicos pueden ser leves y no específicos, aunque en algunos casos pueden ser severos y comprometer la vida del paciente. Los signos clínicos más frecuentes en esta etapa incluyen depresión, letargia, anorexia, fiebre, disnea, secreción oculo-nasal, pérdida de peso y tendencia a la aparición de hemorragias como epistaxis, petequias y equimosis. El examen clínico puede revelar la presencia de linfadenomegalia y esplenomegalia. Asimismo, otros signos clínicos que se asocian a EMC son uveítis anterior, opacidad corneal, hipema, ceguera, convulsiones, ataxia, hiperestesia, temblores, disfunción vestibular y cerebelar (Harrus y

col., 2012; Leiva y col., 2005; Neer y col., 2002.). Mientras que, las anomalías de laboratorio que caracterizan a esta etapa son trombocitopenia, leucopenia, linfocitosis granular, anemia e hipergamaglobulinemia (Baneth y col., 2009; Moonarmart y col., 2014; Weiser y col., 1991).

Posterior al período agudo, los animales que no reciben tratamiento o aquellos tratados en forma inapropiada pueden ingresar en una fase subclínica, la cual se extiende por meses o años (Harrus y col., 2012). Es importante remarcar que en esta etapa los caninos no presentan signos clínicos pero continúan como portadores del microorganismo y por lo tanto, constituyen una fuente de infección (Harrus y col., 1998). A pesar de que los animales pueden encontrarse clínicamente normales en esta fase, desde el laboratorio puede evidenciarse recuento de plaquetas por debajo de los valores de referencia para la especie, hiperglobulinemia, linfocitosis absoluta y neutropenia absoluta (Codner & Farris-Smith, 1986).

Por razones aun no establecidas algunos animales ingresan en la fase crónica de la enfermedad donde los signos clínicos más frecuentes son debilidad, depresión, anorexia, pérdida crónica de peso, palidez de mucosas, fiebre, edema periférico, tendencias hemorrágicas, infecciones secundarias, neumonía intersticial, falla renal y artritis, llegando a la muerte del animal. Mientras que los hallazgos de laboratorios se caracterizan por la reducción en la producción de todas las líneas celulares en la médula ósea y pancitopenia (Harrus y col., 2012; Neer y col., 2002).

Diagnóstico

La importancia de un diagnóstico certero y precoz es necesaria para un tratamiento apropiado en la fase aguda de la enfermedad. Por el contrario, es posible que los caninos no tratados o aquellos tratados en forma inapropiada ingresen en la fase crónica donde el pronóstico para una recuperación satisfactoria es desfavorable (Neer y col., 2002).

El diagnóstico de EMC se establece en forma presuntiva cuando los hallazgos epidemiológicos (residencia o viaje a áreas endémicas, exposición previa a garrapatas), signos clínicos y alteraciones hematológicas y bioquímicas compatibles están presentes. Mientras que la confirmación de la enfermedad se realiza en forma directa mediante la detección del agente o su ADN o bien indirectamente demostrando la respuesta inmune generada posterior a la exposición al microorganismo (Harrus & Waner 2011).

- **Observación de mórulas en extendidos sanguíneos**

Los análisis clínicos son de utilidad debido a que contribuyen a conocer el estado del paciente determinando la presencia de anemia, trombocitopenia, leucopenia o linfocitosis granular. Asimismo, permiten observar las inclusiones o mórulas dentro del citoplasma de monocitos en extendidos de sangre periférica. Sin embargo el diagnóstico basado en este método presenta baja sensibilidad debido a que pocas células se encuentran infectadas y las probabilidades de observarlas son menores especialmente en etapas subclínicas o crónicas de la enfermedad cuando la bacteriemia declina. Ramos y col. (2009) obtuvieron una proporción significativamente mayor de resultados falsos negativos mediante la observación de mórulas en el frotis sanguíneo cuando lo compararon con una técnica de PCR anidada tanto para *E. canis* como *A. platys*. No obstante, otros autores (Hoyos y col., 2007) demostraron un grado de concordancia de $84.7 \pm 11.0\%$ al evaluar 97 caninos (77 con signos clínicos compatibles con EMC y 20 aparentemente normales) mediante el examen hematológico y una prueba de ELISA (Snap 3DX de Laboratorios ®IDEXX). En este estudio, consideraron como positivos las muestras de caninos con signología compatible y que al examen hematológico presentaran trombocitopenia, asociada con anemia o leucopenia y la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en leucocitos, compatibles con bacterias del género *Ehrlichia*. En otros trabajos se determinó la sensibilidad y especificidad del frotis sanguíneo tomando como referencia la técnica de PCR y se obtuvieron valores de 70,1% y 51,0% respectivamente (Romero Perez y col., 2010).

Además las mórulas dentro de los monocitos no permiten determinar en forma precisa que sea una infección con *E. canis* y pueden ser confundidas con otros tipos de células sanguíneas como plaquetas o bien, inclusiones celulares tales como gránulos azurofilos de linfocitos, cuerpos linfoglandulares y material nuclear fagocitado. La citología de aspirados de médula ósea, bazo, ganglio linfático o la tinción de extendidos de capa flogística pueden aumentar la sensibilidad de esta técnica (Iqbal y col., 1994; Mylonakis y col., 2003).

- **Detección del ADN**

La detección de *E. canis* mediante la técnica de PCR constituye una herramienta sensible y específica para la confirmación de casos sospechosos de EMC. Hasta el

momento se han publicado numerosos ensayos basados en la amplificación de diferentes genes (16S ARNr, *p28*, *p30*, *dsb*, *VirB9*; *groESL*) que permiten detectar la familia, género o especie aplicando protocolos de PCR convencional o en tiempo real (Stich y col., 2002; Labruna y col., 2007; Baneth y col., 2009; Cicuttin y col., 2016). La principal ventaja de esta técnica es que permite confirmar infección reciente en una sola muestra del paciente en general antes de que los pacientes muestren seroconversión (Harrus & Waner, 2011; Maggi y col., 2014). Otros beneficios de esta técnica consisten en la capacidad de poder determinar la co-infección de patógenos transmitidos por el mismo vector o que causen enfermedad clínica similar al emplear ensayos de PCR múltiple (Kledmanee y col., 2009; Peleg y col. 2010; Han y col., 2015) y la posibilidad de cuantificar la carga bacteriana en distintos tipos de muestras al emplear ensayos de PCR en tiempo real (Baneth y col., 2009). Asimismo, la utilización de la PCR y posterior secuenciación de los productos amplificados permite la identificación precisa de la especie o cepa actuante (Cicuttin y col., 2016). Además, algunos autores han demostrado que la realización de esta técnica a partir de aspirados de bazo fue más sensible para evaluar la persistencia del agente luego del tratamiento que cuando la misma se realizó a partir de sangre entera periférica (Harrus y col., 2004).

- **Inmunofluorescencia indirecta:**

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) constituye el método *gold standard* para el diagnóstico de EMC. Como ventajas presenta que es una prueba muy sensible debido a que detecta anticuerpos desde los siete días post-infección y además es cuantitativa porque determina el título de anticuerpos del paciente (Iqbal y col., 1994). Sin embargo, algunos animales no se convierten en seropositivos hasta los 28 días post-infección; por lo tanto, en pacientes con signología muy sugestiva de EMC y un primer resultado positivo con esta técnica se recomienda repetir la prueba en 2-3 semanas (Neer y col., 2002).

Por otra parte, para confirmar una infección activa mediante la IFI es necesario evaluar muestras del paciente en el periodo agudo y convaleciente para evidenciar seroconversión (diferencia de 4 veces en el título de anticuerpos) debido a que el nivel de anticuerpos puede persistir por periodos variables incluso cuando el microorganismo ha sido eliminado con el tratamiento. Por lo tanto, en la interpretación de este tipo de pruebas se debe tener presente que una serología positiva implica contacto con el agente,

mientras que la evidencia de seroconversión confirma una infección actual (Çetinkaya y col., 2016; Harrus y col., 1998).

Asimismo, se ha mencionado que la IFI puede dar resultados falsos positivos debido a la existencia de reacciones cruzadas con antígenos de agentes relacionados, especialmente aquellas especies que se encuentran en el mismo género como *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminatum*, y del género *Anaplasma* (Breitschwerdt y col., 1998; Dumler y col., 2001; Mc Bride y col., 2001).

- **Pruebas serológicas rápidas:**

Existe una amplia variedad de pruebas serológicas rápidas para el diagnóstico de EMC como: rMAP2 ELISA, InDx Canine Multitest Dip-S-Ticks (PanBio, InDx), Snap Combo, Snap3Dx (IDEXX Laboratorios), Snap 4Dx (IDEXX Laboratorios), Speed Ehrli (BVT). Bélanger y col., (2002) en un estudio en el que comparaban 4 métodos rápidos de diagnóstico con la técnica de IFI demostraron que el ELISA indirecto rMAP2 constituye el método diagnóstico de elección en áreas con alta prevalencia de la enfermedad o ante la aparición de brotes debido a su alta sensibilidad (96,2%), especificidad (97,7 %) y exactitud (97%). Por su parte, el *kit* InDx Canine Multitest Dip-S-Ticks (PanBio, InDx) demostró los valores más altos de sensibilidad, teniendo además como ventaja que constituye un método semicuantitativo. Sin embargo, la especificidad fue menor con respecto a los otros métodos utilizados (61,4 %) y los títulos no siempre se correspondieron a aquellos obtenidos con la prueba de IFI. Con respecto a las pruebas de Snap Combo y Snap3Dx los valores de sensibilidad obtenidos fueron menores que las pruebas antes mencionadas pero con buenos resultados de especificidad haciéndolas de elección en áreas de baja prevalencia (Bélanger y col., 2002).

En un trabajo realizado por Martin (2004) en cual compararon tres métodos rápidos de diagnóstico (Speed®EHRLI, WITNESS®Ehrlichia, SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli), el *kit* Speed-Ehrli demostró los valores más altos de sensibilidad (86,5 %) siendo la especificidad menor que los otros *kits* utilizados (95%), siempre en comparación con la técnica *gold standard*.

Tratamiento y profilaxis

El tratamiento de la EMC consiste en la administración de antibióticos que logren eliminar el estado de portador de los caninos infectados. La instauración de un tratamiento

adecuado en la fase aguda de la enfermedad incrementa las probabilidades de una respuesta favorable al mismo. Los antibióticos de elección incluyen doxiciclina (5 mg/kg cada 12 h o 10 mg/kg cada 24 h) y minoxiclina (10 mg/kg cada 12 h) ambos administrados durante 4 semanas (Eddlestone y col., 2007). Otros fármacos como el dipropionato de imidocarb han sido utilizados en el tratamiento de EMC; sin embargo, Eddlestone y col. (2006) demostraron que la administración de dos dosis del mencionado fármaco administradas en caninos experimentalmente inoculados con *E. canis* no lograron eliminar la infección, con lo cual su uso no es aconsejado.

Asimismo, en animales con formas más severas de la enfermedad debe instaurarse tratamiento de sostén basado en fluidoterapia, transfusiones sanguíneas y administración de corticoides por períodos cortos (Harrus y col., 2012).

Hasta el momento no hay vacunas disponibles para la prevención de la EMC, y por lo tanto, el control del vector y la quimioprofilaxis son las medidas más adecuadas (Harrus y col., 2012).

Objetivos

Objetivo general

Comparar el método serológico basado en la inmunocromatografía y la técnica de PCR para el diagnóstico *E. canis* en caninos sospechosos de Ciudad Autónoma de Buenos Aires y del sur del Gran Buenos Aires en el período 2014-2016.

Objetivos específicos

- 1) Realizar la técnica serológica inmunocromatográfica a partir de muestras de caninos con diagnóstico presuntivo de EMC para las cuales el diagnóstico solicitado inicialmente fue la técnica de PCR.
- 2) Realizar la técnica de PCR a partir de muestras de caninos con diagnóstico presuntivo de EMC para las cuales el diagnóstico solicitado inicialmente fue la técnica de inmunocromatografía.
- 3) Realizar la técnica de inmunocromatografía y de PCR en un grupo de caninos sin diagnóstico presuntivo de enfermedad clínica.

4) Comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas en los distintos grupos de estudio.

Hipótesis

En caninos con sospecha de EMC deben realizarse estudios serológicos junto con la técnica de PCR para un adecuado diagnóstico.

Metodología

Muestreo

Se utilizaron muestras de sangre entera con anticoagulante EDTA recibidas para diagnóstico de EMC gentilmente proporcionadas por dos centros de diagnóstico, uno en el cual se realiza la técnica serológica (Laboratorio Diagnóstico Veterinario Sur, Quilmes) y el otro la técnica de PCR (Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, IZLP, CABA). Se seleccionaron sólo los animales con diagnóstico clínico presuntivo de EMC procedentes de Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y del sur del Gran Buenos Aires. En todos los casos las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento definitivo.

Además se incluyeron muestras de sangre entera con EDTA de caninos expuestos de las áreas involucradas en el estudio clínicamente sanos derivados al IZLP para esterilización quirúrgica con el fin de establecer los antecedentes de exposición o infección en la población objetivo en este estudio (Grupo 1).

Las muestras obtenidas de pacientes con sospecha de la enfermedad fueron divididas en grupos teniendo en cuenta el resultado previo de la serología y de la técnica de PCR.

Grupo 2: caninos de las áreas involucradas en el estudio, con diagnóstico presuntivo de la enfermedad, en los que se había solicitado la realización de la técnica serológica y su resultado fue negativo.

Grupo 3: caninos de las áreas involucradas en el estudio, con diagnóstico presuntivo de la enfermedad, en los que se había solicitado la realización de la técnica serológica y su resultado fue positivo.

Grupo 4: caninos de las áreas involucradas en el estudio, con diagnóstico presuntivo de la enfermedad, en los que se había solicitado la realización de la técnica de PCR y su resultado fue negativo.

Grupo 5: caninos de las áreas involucradas en el estudio, con diagnóstico presuntivo de la enfermedad, en los que se había solicitado la realización de la técnica de PCR, y su resultado fue positivo a *E. canis*.

El número de muestras incluidas en cada grupo fue de 20.

Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se realizó mediante la prueba inmunocromatográfica (IC) SPEED® EHRLI (BVT, Francia). Este *kit* comercial se basa en la detección de anticuerpos anti-*E. canis* utilizando una membrana inmunocromatográfica (Figura 1). El valor de corte a partir del cual la prueba detecta anticuerpos específicos no es especificado por el fabricante. La sensibilidad y especificidad de la prueba es del 87 % y 95 % respectivamente (Martin, 2004).

Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Brevemente, se añadió una gota de muestra de sangre entera con anticoagulante EDTA con pipeta desechable en posición vertical en el pocillo de la muestra. Inmediatamente después se añadieron en el mismo sitio 5 gotas del reactivo *buffer* proporcionado en el *kit*. La lectura se realizó a los 15 minutos y se consideró como resultado positivo la aparición de dos bandas diferentes de color rosa en la ventana de lectura (banda *test* + banda control) mientras que un resultado negativo reveló la aparición de una sola banda de color rosa (banda control).

Este método fue utilizado para la detección de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en las 60 muestras correspondientes al grupo 1, grupo 4 y grupo 5.



Figura 1: Prueba inmunocromatográfica SPEED® EHRLI

Diagnóstico molecular

El ADN fue extraído de las muestras de sangre con anticoagulante EDTA utilizando el *kit* High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR de tamizaje que utiliza los cebadores EHR16S-D y EHR16S-R (tabla 2) para amplificar un fragmento de 345 pb del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr de la Flia. Anaplasmataceae diseñada por Parola y col. 2000. La sensibilidad de la prueba es de 1000 bacterias por reacción. La PCR fue realizada en 25 μ l de volumen de reacción con 12,5 pmol de cada cebador. La amplificación fue realizada con el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 34 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), *annealing* (55°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 90 segundos) seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los fragmentos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en Tris-EDTA Borato teñidos con bromuro de etidio. En cada reacción de PCR se incluyó un control endógeno para amplificar una región de 289 pb del exón III del gen de beta-actina (IDT, Biodynamics) con el fin de evaluar la presencia de inhibidores. Como control positivo se utilizó *Anaplasma centrale* y como control negativo se usó agua libre de nucleasas.

Para la determinación del patógeno implicado en las muestras positivas se utilizó una PCR anidada para un fragmento del ARNr 16S diseñada por Breitschwerdt y col. (1998) para el diagnóstico rutinario de EMC y otras ehrlichiosis caninas, dado que los cebadores diseñados son específicos de cada especie de *Ehrlichia* implicada en enfermedad en caninos. Los cebadores usados para *E. canis* se detallan en la tabla 2. La PCR fue realizada en 25 μ l de volumen de reacción con 0,1 pmol de cebadores EHR-OUT1 y EHR-

OUT2 en el primer round y 25 pmol de cebadores HE3-R y E. canis en el segundo. El primer round de amplificación consistió de 20 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos y una etapa de *annealing* y extensión a 72°C por 1,5 minutos. El segundo round de amplificación fue de 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, *annealing* a 55°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los fragmentos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en Tris-EDTA Borato teñidos con bromuro de etidio (Breitschwerdt y col., 1998). Complementariamente se realizó una PCR anidada específica de *A. platys*, utilizando los cebadores externos EHR-OUT1 y EHR-OUT2, y cebadores internos E. platys y EhrI3-IP2 que amplifican un fragmento de 151 pb del ARNr 16S. Las condiciones de ciclado fueron las mismas a las descritas para la PCR anidada específica de *E. canis* (Kordick y col., 1999).

Tabla 2: Secuencia de cebadores utilizados en este estudio

	Cebadores	Secuencia (5'3')	Referencias
Flia. Anaplasmatocae	EHR16S	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	Parola y col., 2000
	-D		
	EHR16S	TAGCACTCATCGTTTACAGC	
	-R		
Cebadores externos Flia. Anaplasmatocae	EHR-OUT1	CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCCAACATC TCACGAC	Breitschwerdt y col., 1998
	EHR-OUT2	GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA CGAC	
Cebadores internos para <i>E. canis</i>	HE3-R	CTTCTATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	Breitschwerdt y col., 1998
	E. canis	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA	
Cebadores internos para <i>A. platys</i>	E. platys	GAT TTTTGTTCGTAGCTTGCTA	Kordick y col., 1999
	EhrI3-IP2	TCATCTAATAGCGATAAATC	

Esta técnica diagnóstica fue utilizada para la detección de *E. canis* en las 60 muestras correspondientes al grupo 1, grupo 2 y grupo 3.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron codificados e ingresados a una base de datos en Microsoft Access para su correspondiente procesamiento, análisis e interpretación de los resultados.

El análisis estadístico se realizó utilizando Epi Info 7.1.2.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EEUU) y WinEpi (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza). La concordancia entre los resultados obtenidos con la técnica serológica y PCR fue evaluada mediante el cálculo del índice Kappa.

De acuerdo a los siguientes valores de Kappa la concordancia entre las pruebas se clasificó en: 0 - 0,40: escasa; 0,41-0,60: moderada; 0.61-0.80: adecuada; 0.81-1: perfecta (Landis & Koch, 1977)

Resultados

Los resultados obtenidos con la IC y con la técnica de PCR correspondientes al total de la población evaluada en este estudio se muestran en la tabla 3. Las muestras positivas a la PCR de tamizaje y la determinación posterior del patógeno implicado mediante la PCR anidada específica de *E. canis* y *A. platys* se muestran en la figura 2, 3 y 4. El control endógeno que amplifica el fragmento de 289 pb del gen de beta-actina utilizado en la PCR de tamizaje fue positivo en todas las reacciones de PCR (Figura 2).

Tabla 3: Resultados de las técnicas de PCR y de Inmunocromatografía en el total de la población canina expresado en porcentaje.

Grupos	N° de animales	IC positivo (%)	PCR positivo (%)	Concordancia entre positivos (%)
1	20	0(0%)	0(0%)	-
2	20	0 (0)	1(5%)	0/1 (0)
3	20	20(100%)	5(25%)	5/20 (25)
4	20	4(20%)	0(0%)	0/4 (0)
5	20	17(85%)	20(100%)	17/20 (85)

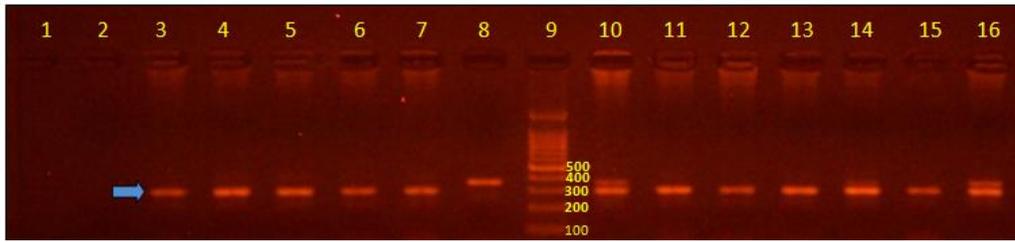


Figura 2: Gel de agarosa de la PCR de tamizaje que amplifica un fragmento de 345 pb del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S ARNr de familia la Anaplasmataceae.

Calle 1: control negativo de PCR. Calle 2: control negativo de extracción de ADN. Calle 3-7 y 11-15: muestras clínicas negativas. Calle 10 y 16: muestras clínicas positivas. Calle 8: control positivo de PCR. Calle 9: Marcador de peso molecular de ADN, 100pb. Flecha azul: banda correspondiente al control endógeno de beta-actina.

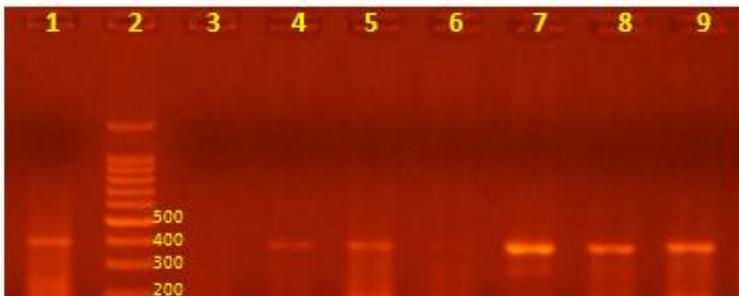


Figura 3: Gel de agarosa de la PCR anidada específica de *E. canis* que amplifica un fragmento de 389 pb del ARNr 16S. Calle 1: control positivo de PCR. Calle 2: Marcador de peso molecular de ADN, 100bp. Calle 3: control negativo de la PCR. Calle 4-9 muestras clínicas positivas.

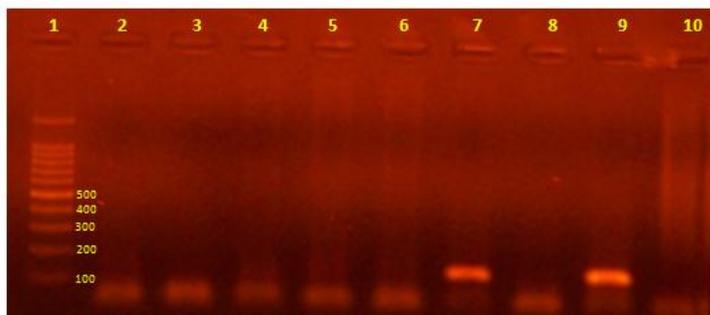


Figura 4: Gel de agarosa de la PCR anidada específica de *A. platys* que amplifica un fragmento de 151 pb. Calle 1: Marcador de peso molecular de ADN, 100bp. Calle 2-6 y 8: muestras clínicas negativas. Calle 7: muestra clínica positiva. Calle 9: control positivo de PCR. Calle 10: control negativo de la PCR.

.La concordancia entre la técnica serológica de IC y la técnica de PCR en el total de la población estudiada fue moderada (valor de kappa: 0,496 95% IC 0.311-0,682).

Las 20 muestras de caninos clínicamente sanos (grupo 1) fueron negativas tanto para la detección de anticuerpos por la IC como para la detección de ADN por la técnica de PCR de tamizaje.

En el grupo 2 y 3 (pacientes con diagnóstico presuntivo de EMC para las cuales la prueba realizada inicialmente fue la IC y luego se realizó la PCR) la concordancia entre las pruebas fue escasa (valor de índice kappa: 0,200 95% IC -0.021- 0.421). En el grupo 2 se obtuvo un resultado positivo por PCR específica a *E. canis*; mientras que otro canino fue positivo a *A. platys*.

En el grupo 4 y 5 (pacientes con diagnóstico presuntivo de EMC para las cuales la prueba inicialmente solicitada fue la técnica de PCR y luego se realizó la técnica serológica de IC) la concordancia entre las pruebas fue adecuada (valor de índice kappa: 0,650 95% IC 0.340-0.960).

Discusión y conclusiones

En los últimos años, las enfermedades transmitidas por vectores en caninos han ganado importancia debido a que varias de ellas son reconocidas como potenciales zoonosis y los agentes que las causan se han convertido en patógenos emergentes tanto en humanos como en animales (Silva y col 2014; Nicholson y col., 2010; Tamí & Tamí 2004). Particularmente en el caso de la EMC ha aumentado la demanda diagnóstica por parte de los veterinarios clínicos. La presentación clínica inespecífica y la superposición de signos clínicos con otras enfermedades infecciosas ha incrementado la sospecha clínica hacia la EMC. La presencia de otros patógenos transmitidos por garrapatas (tales como *Hepatozoon* spp. o *Babesia* spp.) debe ser considerada junto con la posible infección con *E. canis* (Gal y col., 2010).

En la EMC se debe tener presente que no existe un único método para arribar al diagnóstico definitivo de la enfermedad y que numerosos factores deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos con los ensayos elegidos. Como en toda enfermedad infecciosa existe una triada en la que el agente (comportamiento biológico, factores de virulencia, presencia de vectores competentes), el medio ambiente (condiciones favorables para la sobrevivencia del vector, presencia de reservorios) y el

hospedador (variación en la respuesta inmune, co-infección con otros patógenos) interactúan y en última instancia determinan el curso de la infección (Waner y col., 2001; Otranto y col., 2009). Asimismo, el momento de recolección de muestras, la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba utilizada influyen de manera directa en la interpretación final (Otranto y col., 2009; Harrus y col., 2012).

En nuestro país las técnicas de PCR, y de IC han sido utilizadas para el estudio de EMC demostrando su utilidad en la detección de ADN o anticuerpos (Eiras y col., 2013; Mera y Sierra y Neira, 2014; Cicuttin y col., 2016). No obstante, la comparación entre estas pruebas directas e indirectas a partir de muestras de caninos naturalmente infectados proporciona información valiosa para el diagnóstico de la EMC en la práctica clínica.

La concordancia observada al evaluar las pruebas de PCR y de IC utilizadas en este estudio en el total de la población canina presentó un valor moderado, al igual que lo reportado por otros autores (Maggi y col., 2014).

Todos los caninos incluidos en el grupo 1 (expuestos, sin signología de EMC) fueron negativos tanto por la técnica de PCR como por la IC. Estos hallazgos coinciden con reportes previos de otros autores en CABA y Gran Bs. As., como también en las provincias de Córdoba y Santa fe (Cicuttin y col., 2015; Mascarelli y col., 2016) en los cuales no se detectó ADN de *E. canis* en muestras obtenidas de caninos clínicamente sanos. No obstante, estudios llevados a cabo en CABA y Bahía Blanca reportaron valores de prevalencia del 13,5 al 37,5% para *A. platys* (Cicuttin y col., 2011; Cicuttin y col., 2014a; Cicuttin y col., 2014b). Estas diferencias en la prevalencia de este último patógeno probablemente se deban, entre otros factores, al área de la cual se extrajeron las muestras, al momento del año en el que se realizó el estudio y al número de animales muestreados.

Con respecto al grupo de animales para los cuales el clínico veterinario solicitó en primera instancia la prueba serológica (grupos 2 y 3) observamos baja concordancia entre los métodos evaluados. El hallazgo de un canino positivo por PCR y negativo por IC podría reflejar el comienzo de la enfermedad con presencia de bacteriemia y ausencia de anticuerpos detectables (Iqbal y col., 1994). Cabe destacar que la utilización de la PCR de tamizaje (combinada con la PCR anidada específica) en este grupo de muestras permitió detectar también la infección con *A. platys* en un paciente en el cual la serología había sido negativa. Por otro lado, sólo 5 caninos del grupo 3 fueron positivos también por PCR,

lo cual puede ser debido a varios factores. En primer lugar, podría tratarse de resultados falsos positivos de la IC en animales que mantienen títulos de anticuerpos detectables posterior a la recuperación de la infección o que han estado expuestos al agente (Iqbal y col., 1994; Wen y col., 1997; Centikaya y col., 2016; Harrus y col., 1998). Se debe considerar además que existen reacciones cruzadas entre *E. canis* y otras cepas de *Ehrlichia* (que circulan en garrapatas de nuestro país), así como en menor medida con *A. platys* (Dumlar y col., 2001; Harrus y col., 2012; Cicuttin y col., 2017). En segundo lugar, el envío de muestras de pacientes que han recibido tratamiento con antibióticos (lo cual no es discriminado en el protocolo de envío de muestras) disminuye o elimina la cantidad de microorganismos circulantes en sangre ocasionando resultados falsos negativos por la técnica de PCR. Asimismo, algunos autores han mencionado que la persistencia de *E. canis* en médula ósea o bazo (fase crónica de la EMC) con bajos niveles de microorganismos en sangre periférica podría resultar en concentraciones de ADN por debajo del límite de detección de la PCR (Otranto et al., 2010; Harrus y col., 2012). Finalmente, la presencia de inhibidores de la enzima polimerasa en las muestras de sangre entera puede afectar la amplificación y eficiencia de la técnica de PCR, ocasionando resultados falsos negativos (Harrus y col., 2011). En nuestro estudio, se incluyó en cada reacción de PCR un control endógeno de amplificación que permitió monitorear si la reacción fue inhibida.

Con respecto a los grupos 4 y 5 para los cuales los veterinarios clínicos solicitaron en primera instancia la técnica de PCR, se observó una concordancia adecuada entre ambas pruebas. Las muestras negativas por PCR pero positivas por IC obtenidas en el grupo 4 pueden deberse a los factores antes mencionados. Mientras que las muestras positivas por PCR y negativas por IC pueden haber sido extraídas en la etapa aguda de la enfermedad antes de que el sistema inmune desarrolle una respuesta de anticuerpos detectable (Harrus y col., 1998). En este contexto, cuando se utilizan pruebas serológicas cualitativas rápidas es importante considerar el punto de corte definido por el fabricante. Por ejemplo, el kit Snap 4D plus (IDEXX) fue estandarizado para la detección de un título de anticuerpos por encima de 1/160. Es decir, que toda muestra que presente niveles de anticuerpos menores a ese valor dará un resultado negativo (Harrus y col., 2012). El valor de corte para el *kit* inmunocromatográfico Speed-Ehrli no es especificado sin embargo es posible que se encuentre en un rango similar. Según estudios previos, los métodos basados en ELISA de membrana o IC son capaces de diferenciar animales seronegativos

y seropositivos cuando el título de anticuerpos es $\geq 1/320$, mientras que los títulos menores podrían ocasionar falsos negativos (Waner y col., 2000).

La ausencia de *E. canis* en caninos de los diferentes grupos puede ser explicada si tenemos en cuenta que sólo *R. sanguineus* del linaje templado ha sido detectado en el área en que se realizó el muestreo y como fue mencionado, los estudios epidemiológicos y experimentales relacionan a *E. canis* con el linaje tropical y no con el templado. Por otro lado, el hallazgo de animales con infección activa (detectada por PCR) plantea el interrogante del modo de transmisión en estos casos. Cicuttin y col., (2016) mencionaron posibles explicaciones que contribuyen a entender esta cuestión: 1) los caninos podrían haber adquirido la infección en otras áreas; 2) *R. sanguineus* del linaje templado presentaría baja, pero no nula, capacidad vectorial para transmitir *E. canis*; 3) la migración de caninos del norte de nuestro país a esta zona podría haber creado focos locales de *R. sanguineus* del linaje tropical durante la época climática favorable.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio sugieren que la combinación de métodos moleculares y serológicos incrementa la certeza en el diagnóstico de EMC. La utilización de pruebas serológicas rápidas como tamizaje inicial, junto con la posterior confirmación mediante PCR, en el marco de una correcta evaluación clínica del paciente, permitirán mejorar el diagnóstico de la EMC.

Bibliografía

Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A, Valiente-Echeverría F, León U, Gutjahr C, and Teresa Azócar. *Anaplasma platys* in Dogs, Chile Emerg Infect Dis. 2007; 13(9): 1392–1395.

Baneth G, Harrus S, Ohnona FS, Schlesinger Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. Vet. Microbiol. 2009; 136(3–4):321–5.

Bélanger M, Sorenson HL, France MK, Bowie MV, Barbet AF, Breitschwerdt EB, Alleman AR. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. J Clin Microbiol. 2002; 40(9):3506-8.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2645-51.

Bremer WG, Schaefer JJ, Wagner ER, Ewing SA, Rikihisa Y, Needham GR, Jittapalapong S, Moore DL, Stich RW. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. Vet Parasitol. 2005; 15;131(1-2):95-105.

Bronson E, Emmons LH, Murray S, Dubovi EJ, Deem SL. Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. J Zoo Wildl Med. 2008; 39(1):28-36.

Cardoso L, Gilad M, Cortes HC, Nachum-Biala Y, Lopes AP, Vila-Viçosa MJ, Simões M, Rodrigues PA, Baneth G. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. Parasit Vectors. 2015 ;23;8:144.

Çetinkaya H, Matur E, Akyazi İ, Ekiz EE, Aydın L, Toparlak M. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. Ticks Tick Borne Dis. 2016; 2.

Cicuttin GL; Navarro O Connor M, Lobo B, Jado I. Evidencia molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Revista FAVE,Ciencias Veterinarias. 2011; 10 (2), 19-23.

Cicuttin GL, Brambati DF, Rodríguez Eugui JI, Lebrero CG, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE, Jado I, Anda P. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs. Buenos Aires (Argentina).Ticks Tick-borne Dis. 2014a; 5, 484–488.

Cicuttin GL, Vidal P, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). Rev. Chil. Infect. 2014b; 31, 563–568.

Cicuttin GL, De Salvo MN, Gury Dohmen FE. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. Ticks Tick-borne Dis. 2016. 7: 954-957.

Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. 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. 2015;6(6):724-9.

Cicuttin GL, De Salvo MN, Nava S. Two novel *Ehrlichia* strains detected in *Amblyomma tigrinum* ticks associated to dogs in peri-urban areas of Argentina. En prensa

Codner EC, Farris-Smith LL. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J Am Vet Med Assoc. 1986, 1; 189(1):47-50.

de Almeida A.B.P.F., de Paula D.A.J., Dutra V., Nakazato L., Mendonc A.J. , Sousa V.R.F. Infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cadelas e neonatos de Cuiabá, Mato Grosso, Arch. Vet. Sci. 15 (3) (2010) 127–134.

da Costa AP, Costa FB, Labruna MB, Silveira I, Moraes-Filho J, Soares JF, Spolidorio MG, Guerra Rde M. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2015;24(1):28-35.

Dumler JS, Barbet A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. 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*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001; 51, 2145–2165.

Eddlestone SM, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Gill A, Hosgood G, Hegarty B, Breitschwerdt EB. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Vet Intern Med. 2006; 20(4):840-4.

Eddlestone SM, Diniz PP, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Cho D, Hosgood G, Hegarty B, Breitschwerdt EB. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Vet Intern Med. 2007;21(6):1237-42.

Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36, 169–173.

Gal A, Harrus S, Arcoh I, Lavy E, Aizenberg I, Mekuzas-Yisaschar Y, Baneth G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Can. Vet. J.* 2007. 48, 619–622.

Guedes PE, Oliveira TN, Carvalho FS, Carlos RS, Albuquerque GR, Munhoz AD, Wenceslau AA, Silva FL. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015;24(2):115-21.

Han JI, Chang DW, Na KJ. A multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction panel for detecting neurologic pathogens in dogs with meningoencephalitis. *J Vet Sci.* 2015;16(3):341-7.

Harrus S, Waner T, Aizenberg J, Foley J, Poland A, Bark H: Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 1998, 36, 73-76.

Harrus S, Alleman AR, Bark H, Mahan SM, Waner T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol.* 2002; 24; 86(4):361-8.

Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Vet. J.* 2011; 187; 292–296.

Harrus S, Waner P, Mark Neer T (2012). Ehrlichia and Anaplasma Infections in Greene. *Infectious diseases of the dog and cat.* Fourth edition p 227-259.

Hegarty BC, Qurollo BA, Thomas B, Park K, Chandrashekar R, Beall MJ, Thatcher B, Breitschwerdt EB. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. *Parasit Vectors.* 2015; 12;8:320.

Hoyos LS, Li OE, Alvarado AS, Suárez FA, Díaz DC. Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. *Rev Inv Vet Perú.* 2007; 18 (2): 129-135.

Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7): 1658–1662.

Klag AR, Dunbar LE, Girard CA: Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog. *Can Vet J.* 1991, 32:305–307.

Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, Chatsiriwech J, Suksai P, Suwannachat P, Sariya L, Buddhirongawatr R, Charoonrut P, Chaichoun K. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2009; 40, 35–39.

Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradle JM, Rumbough R, Mcpherson JT, MacCormack JN. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Houndkennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 37, 2631–2638.

Labruna MB, McBride JW, Camargo LM, Aguiar DM, Yabsley MJ, Davidson WR, Stromdahl EY, Williamson PC, Stich RW, Long SW, Camargo EP, Walker DH. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet Parasitol.* 2007; 31; 143(2):189-95.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33(1): 159-174.

Lasta CS, dos Santos AP, Messick JB, Oliveira ST, Biondo AW, Vieira RF, Dalmolin ML, González FH. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013; 22(3):360-6.

Leiva M, Naranjo C, Peña MT. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Vet Ophthalmol.* 2005; 8(6):387-93.

López J, Castillo A, Muñoz M, Hildebrand S. Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. *Arch Med Vet.* 1999; 31: 211-4.

López J, Abarca K, Mundaca MI, Caballero C, Valiente-Echeverría F. Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2012; 29 (5): 527-530.

Maggi RG, Birkenheuer AJ, Hegarty BC, Bradley JM, Levy MG, Breitschwerdt E. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 127.

Mascarelli PE, Tartara GP, Pereyra NB, Maggi RG. Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasit Vectors*. 2016; 15;9(1):642.

Martin C.: Les Ehrlichioses du chien, étude bibliographique, diagnostic et comparaison de trois kits de diagnostic serologique rapide de l'ehrlichiose monocyttaire; Thèse Med Vet Lyon 2004.

Mcbride JW, Corstvet RE, Breitschwerdt EB and Walker DH. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection with Recombinant Proteins. *J Clin Microbiol*. 2001, 39; 1: 315–322.

Mera y Sierra R, Neira G. Ocurrencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la provincia de Mendoza.2014.

http://200.123.165.129/archivos/congreso_zoonosis/congreso/resumenes/Ocurrencia%20de%20Ehrlichia%20canis%20en%20caninos.pdf

Moonarmart W, Sungpradit S, Rawangchue T, Suphaphiphat K, Suksusieng S, Jirapattharasate C. Clinical history and hematological findings among canines with monocytic ehrlichiosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2014;45(1):157-66.

Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. 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*. 2015; 28;10 (9):e0139386.

Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, Rallis T, Fytianou A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol*. 2003; 2;91(2-3):197-204.

Nair ADS, Cheng C, Ganta CK, Sanderson MW, Alleman AR, Munderloh UG, Gantaet RR. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS ONE* 2016; 11(2): e0148239.

Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol.* 2012; 21;190(3-4):547-55.

Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med.* 2002;16(3):309-15.

Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE: The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.* 2010, 26:205–212.

Oscherov EB, Milano AMF, Lobo B, Anda P, Escudero R. Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 2011; 70, 42–48.

Otranto D, DantasTorres F, Breitschwerdt E. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 2009;25 (4): 157–163.

Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa, MS, Diniz PP, de Caprariis D, Lia RP, Mencke N, Stanneck D, Capelli G, Breitschwerdt EB. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J. Clin. Microbiol.* 2010.; 48 (9), 3316–3324.

Parola P, Roux V, Camicas J L, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94: 707-9.

Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet Parasitol.* 2010; 29;173(3-4):292-9.

Ramos CAN, Ramos, RAN, Araújo FR, Guedes DS, Souza IIF, Ono TM, Vieira AS, Pimentel DS, Rosas EO, Faustino MAG, Alves LC. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2009; 18, 1: 58-62.

Romero Pérez LE, Wiedner GD, Romero Zúñiga JJ, Meneses Guevara A, Jiménez Soto M, Salazar Sánchez L. Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en caninos de Costa Rica. *Rev. Ciencias Veterinarias.* 2010; 28 (1): 23-36.

Rotondano TE, Almeida HK, Krawczak Fda S, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB, de Azevedo SS, Ade lmeida AM, de Melo MA. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2015 ;24(1):52-8.

Silva A, Pina Canseco S, Gabriel de la Torre Mdel P, Mayoral Silva A, Mayoral MÁ, Pérez-Campos Mayoral L, López Martínez J, Pérez-Campos E. [Asymptomatic human infection from contact with dogs: a case of human ehrlichiosis]. Gac Med Mex. 2014; 150(2):171-4.

Stich RW, Rikihisa Y, Ewing SA, Needham GR, Grover DL, Jittapalapong S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. J Clin Microbiol. 2002; 40(2):540-6.

Tamí CD, Tamí I. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana en Venezuela. Rev Panam Salud Publica. 2004; 16: 345-9.

Taques II, Barbosa TR, Martini AC, Pitchenin LC, Braga ÍA, de Melo AL, Nakazato L, Dutra V, de Aguiar DM. Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2016; 49:47-50.

Unvera A, Rikihisa Y, Karaman M, Ozen H. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. Clin Microbiol Infect. 2009; 15 Suppl 2: 59-61.

Venzal JM, Estrada Peña A, Castro O, De Souza CG, Portillo A and Oteo JA. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. Parasitol Latinoam. 2007;62: 23 – 26.

Vieira RF, Biondo AW, Guimarães AM, Dos Santos AP, Dos Santos RP, Dutra LH, Diniz PP, de Moraes HA, Messick JB, Labruna MB, Vidotto O. Ehrlichiosis in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011; 20(1):1-12.

Waner T, Strenger C, Keysary A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. J Vet Diagn Invest. 2000; 12: 240–244.

Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AW. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol.* 2001; 95(1):1-15.

Weiser MG, Thrall MA, Fulton R, et al. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1991;27:84–88.

Wen B, Rikihisa Y, Mott J M, Greene R, Kim H Y, Zhi N, Couto G C, Unver A, Bartsch R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(7): 1852–1855.