

Estudio molecular de Ehrlichiosis monocítica canina en la ciudad de Machala, Ecuador

Molecular study of Canine monocytic Ehrlichiosis in the City of Machala, Ecuador

Stalin Yhovanny Correa-Vivanco¹, Ana Elizabeth Guerrero-López^{1,2*}, Lorena Elizabeth Chalco-Torres², Robert Gustavo Sánchez Prado²,
Mauro Nirchio-Tursellino²

¹Universidad Técnica de Machala, Programa de Maestría en Medicina Veterinaria. Machala, El Oro, Ecuador.

²Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Machala, El Oro, Ecuador.

*Autor para correspondencia: aguerrero@utmachala.edu.ec

RESUMEN

La Ehrlichiosis monocítica canina (EMC), una enfermedad emergente causada por *Ehrlichia canis*. Este patógeno se encuentra comúnmente en perros y otros canidos silvestres que actúan como reservorios naturales. La EMC es prevalente en regiones tropicales y subtropicales, por la presencia de la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, que actúa como vector principal, siendo América Latina una región afectada. La enfermedad se manifiesta en tres etapas clínicas: aguda, subclínica y crónica, con síntomas como depresión, letargo, anorexia, hemorragias, y cambios en los parámetros hematológicos. El diagnóstico de *E. canis* puede ser a través de pruebas serológicas y moleculares, siendo la PCR dirigida al gen 16S rRNA considerada la técnica más fiable. El estudio se llevó a cabo en perros con sintomatología clínica en una clínica veterinaria en Ecuador. Se realizaron test de inmunocromatografía y reacción de cadena de polimerasa para identificar la presencia de *E. canis*. Se evidenció que las pruebas serológicas presentan una tasa de positividad superior, pero pueden generar falsos positivos debido al tiempo post infección. La PCR permite la detección temprana, incluso en fases subclínicas, ofreciendo la posibilidad de iniciar el tratamiento antes de la manifestación de síntomas. Se concluye destacando la importancia de realizar combinación de pruebas de laboratorio para un diagnóstico más fiable de la EMC en perros, identificando precozmente caninos como posibles fuentes de transmisión zoonótica de *E. canis* a los humanos.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*; *Rhipicephalus sanguineus*; Caninos; PCR; Inmunocromatografía

ABSTRACT

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME), an emerging disease caused by *Ehrlichia canis*. This pathogen is commonly found in dogs and other wild canids acting as natural reservoirs. CME is prevalent in tropical and subtropical regions, due to the presence of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, which acts as the main vector, with Latin America being an affected region. The disease manifests in three clinical stages: acute, subclinical, and chronic, with symptoms such as depression, lethargy, anorexia, hemorrhages, and changes in hematological parameters. The diagnosis of *E. canis* can be made through serological and molecular tests, with PCR targeting the 16S rRNA gene considered the most reliable technique. The study was conducted on dogs with clinical symptoms at a veterinary clinic in Ecuador. Immunochromatographic tests and polymerase chain reaction were performed to identify the presence of *E. canis*. It was evident that serological tests have a higher positivity rate but can generate false positives due to post-infection time. PCR allows early detection, even in subclinical phases, offering the possibility of starting treatment before the manifestation of symptoms. It is concluded by emphasizing the importance of performing a combination of laboratory tests for a more reliable diagnosis of CME in dogs, identifying dogs early as possible sources of zoonotic transmission of *E. canis* to humans.

Key words: *Ehrlichia canis*; *Rhipicephalus sanguineus*; canines; PCR; immunochromatography

INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis monocítica (EMC) canina es una enfermedad infecciosa emergente causada por *Ehrlichia canis* [1]. Este patógeno se identifica con mayor frecuencia en perros domésticos, así como en zorros, coyotes y chacales, que también son reconocidos como reservorios naturales de este agente [2].

Esta patología es prevalente en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial. Su existencia está vinculada al vector conocido como la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* [1]. Esta tendencia es notable en América Latina, donde se han identificado diversos focos de infección causados por *E. canis* [3, 4, 5].

Esta enfermedad puede manifestarse en tres etapas clínicas: aguda, subclínica y crónica [5, 6]. La presencia de diversos signos clínicos, tales como depresión, letargo, anorexia, pérdida de peso y propensión a hemorragias, son compatibles a EMC. Además, durante la exploración física, se observan linfadenomegalia y esplenomegalia [6]. Sin embargo, los signos presentes en este cuadro clínico son compartibles por varios agentes infecciosos, lo que complica la identificación precisa de la enfermedad [7].

Ehrlichia canis provoca cambios en los parámetros hematológicos de los perros, tales como anemia normocítica normocrómica, trombocitopenia, linfocitosis y monocitosis, ya sea de manera aislada o en combinación, acompañadas ocasionalmente de leucopenia [8, 9]. Investigaciones relatan que la trombocitopenia como una de las alteraciones hematológicas más comunes en perros con infección por *E. canis* [10]. Es importante señalar que la EMC es una zoonosis emergente que puede transmitirse a los humanos a través de la picadura de garrapatas infectadas [11].

Los métodos de diagnóstico presentan distintos niveles de sensibilidad y especificidad, por lo que se debe elegir el más apropiado según la sintomatología y el tiempo transcurrido desde la infección [12]. Por esa razón deberíamos saber desde cuando presentaba signos clínicos cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, así como los diferentes grupos etarios que participaron, las razas, pesos, si todos eran autóctonos de la región, El análisis citológico posibilita la observación de mórulas en extensiones de sangre periférica, aunque su sensibilidad es baja, pudiendo aumentar al emplear la tinción de la capa leucocitaria [13]. El cultivo celular, aunque altamente sensible y confirmatorio, requiere un extenso período, aproximadamente un mes, para arrojar resultados [14].

En contraste para el diagnóstico serológico, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es considerada una prueba oro ya presenta una sensibilidad que oscila entre el 87% y el 100%, así como una especificidad comprendida entre el 77% y el 100. Dado que la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) requiere laboratorios y equipos especializados, se han creado pruebas comerciales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y un ensayo de inmunocromatografía rápida (ICA) con el objetivo de simplificar y agilizar el diagnóstico serológico. Lamentablemente, los desafíos relacionados con la reactividad cruzada aún representarían un obstáculo para obtener un diagnóstico definitivo en estas pruebas [15].

Diversos estudios han identificado la Reacción de cadena de polimerasa (PCR), especialmente el método de PCR dirigido al 16SrRNA como la técnica de laboratorio más fiable para diagnosticar la infección por *E. canis* [16].

Estudios moleculares de *E. canis* en la región sur del Ecuador son escasos debido a la frecuencia y endemidad de la enfermedad es necesario el empleo de métodos de diagnósticos más específicos para *E. canis* por ello se establece como objetivo identificar mediante técnica molecular *E. canis* en perros con sintomatología clínica atendidos en la clínica docente de especialidades veterinarias de la Universidad de Machala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio descriptivo, transversal en 478 pacientes caninos atendidos en la clínica docente de especialidades veterinarias de la Universidad de Machala durante los meses de abril a junio de 2023. La población de estudio comprendió 123 pacientes caninos, mestizos de los cuales 70 eran machos y 53 hembras. Los criterios de inclusión se basaron en la identificación durante la anamnesis y exploración física de signos clínicos compatibles con EMC, como falta de apetito, letargia, ataxia, debilidad, fiebre, petequias, equimosis, epistaxis, hemorragia en esclerótica presencia de garrapatas y un periodo de evolución de los signos de 4 días (petequia, equimosis, emesis, hemorragia en esclerótica, epistaxis ataxia, debilidad, etc).

Resultaría importante haber profundizado en la anamnesis de todos los pacientes para indagar el periodo de tiempo durante el cual habían presentado los síntomas y de esa forma tratar de establecer grupos de los pacientes en fase aguda, subclínica y crónica

Para la obtención de muestras, se realizó una extracción de sangre mediante punción aséptica de la vena cefálica, extrayendo 3 ml de sangre, que se colocaron en tubos con el anticoagulante ácido etilendiamino tetracético (EDTA). Posteriormente, se llevó a cabo la determinación del hemograma de rutina utilizando el contador hematológico (marca VETSCAN, modelo HM5, Zoetis, Hungría) un contador de células compacto y totalmente automatizado diseñado para el diagnóstico *in vitro*.

A los pacientes que presentaron signos clínicos y alteraciones hematológicas sugestivas de EMC, se les realizaron pruebas de inmunocromatografía Canivet-4 para *Anaplasma/Ehrlichia/Lyme/Dirofilaria immitis*. Aquellas muestras de pacientes que resultaron positivas en la prueba serológica fueron refrigeradas y se procedió a su almacenamiento a una temperatura de 5°C para su conservación, con el propósito de llevar a cabo pruebas moleculares posteriormente.

Análisis Molecular

La muestra de sangre fue sometida de inmediato al protocolo de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico utilizando el kit GenElute™ (Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Catálogo N° G1N350, EUA), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. La cantidad y pureza del extracto se evaluaron mediante un equipo (Nanodrop 2000c de Thermo Fisher®, EUA).

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizaron los cebadores ECP1: 5'-GGTAATACTGTATAATCCCC-3' (directo) y HE3: 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT-3' (inverso), que amplifican un fragmento del gen 16S rRNA de *E. canis* con una temperatura de anillamiento de 50°C [17]. También se emplearon los cebadores EEM2F (5'-GGAGCTAAAATAGAAGATATTC-3') y EEM1R (5'-GTGCAAAAAGGTAATACA T-3') para amplificar un fragmento del gen *p28* de *E. ewingii* con una temperatura de anillamiento de 55°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µL, que contenía: 12,8 µL de agua purificada, 2 µL de tampón de PCR 10×, 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP (2 mM), 1 µL de cada cebador (5 mM), 0,2 µL de 1,25 unidades de Taq polimerasa, y 1 µL de ADN genómico (50–100 ng·µL⁻¹).

Los ciclos de PCR se llevaron a cabo según las siguientes especificaciones: 95°C durante 2 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 50–55°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 1 min [3, 15, 16]. La amplificación se realizó en un Termociclador (Mastercycler Pro S, Eppendorf, Alemania).

Se procedió a confirmar la presencia de los productos amplificados mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando tampón TAE. Para la visualización de los fragmentos, se empleó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) de Sigma Aldrich y GelRed como tinte fluorescente. La observación de los amplicones y el marcador de referencia se llevó a cabo en un transiluminador ultravioleta (UV)(UVP, M-V26, EUA).

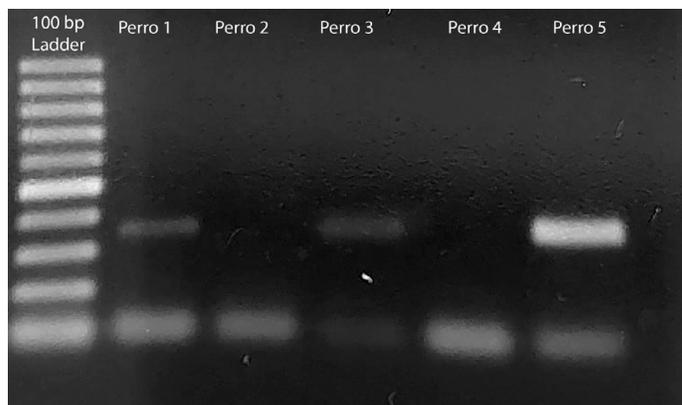


FIGURA 1. Electroforesis con gel de agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación con los cebadores ECP1 y HE3. Carril 1 mostrando un marcador de peso molecular de 100 pares de bases, carril 1,3,5 pacientes positivos a *E. canis*

RESULTADOS Y DISCUSION

De la totalidad de 123 pacientes que presentaron sintomatología a *E. canis* en la clínica veterinaria UTMACH de acuerdo a los criterios de inclusión planteados, 29 pacientes dieron positivos a la técnica de ICA representando el 23,58 % la positividad de esta prueba nos indica la presencia de anticuerpos contra la *Ehrlichia*, pudiendo generar falsos positivos. (la positividad de esta prueba nos indica la presencia de anticuerpos contra la ehrlichia, pudiendo generar falsos positivos). Las 29 muestras sanguíneas positivas al test de ICA fueron analizadas por el respectivo test molecular dando como resultado 15 pacientes positivos.

Las alteraciones hematológicas encontradas fueron relacionadas con los resultados del test serológico y molecular como lo muestra la Tabla I.

Se logró generar un producto de aproximadamente 393 pares de bases (FIG. 1), utilizando los cebadores ECP1 y HE3, el cual resultó ser más corto que los 495 pares de bases anticipados para la amplificación del fragmento del gen 16S rARN de *E. canis* [19]. Además, se observó una banda tenue ligeramente superior a los

100 pares de bases, que se atribuye a la presencia de los propios cebadores, tal como lo encontró otro estudio molecular [18].

En la actualidad, la importancia mundial de la EMC ha aumentado significativamente, principalmente porque la especie de garrapata responsable de su transmisión *R. sanguineus* es reconocida como la de mayor distribución geográfica [19].

Las infecciones provocadas por *E. canis* son endémicas en áreas geográficas tropicales y subtropicales, donde la población de la garrapata portadora, *R. sanguineus*, está en aumento [20, 21]. La zona costera del sur de Ecuador, en la cual se centró la investigación, se distingue por su clima tropical, creando condiciones propicias para el desarrollo y la presencia habitual del vector de la enfermedad, *R. sanguineus*.

En el examen de 29 muestras a través de PCR, se identificaron 15 casos positivos, equivalente al 52 %. Estos resultados concuerdan con los descubrimientos en Naranjal, Ecuador, donde se observó un porcentaje del 52.94 % de pacientes con resultados positivos para EMC [22]. Sin embargo, estos datos difieren a los encontrados en Nigeria 26 % [23], Tailandia 39,1 % [24], Colombia 15,3 % [25], Paraguay 10.41 % [26].

Esta investigación respalda la noción de que los estudios serológicos exhiben una tasa de positividad superior en comparación con los análisis moleculares, corroborando descubrimientos previos en otros estudios [27, 28]. No obstante, es crucial destacar la influencia de las condiciones climáticas en el lugar donde se lleva a cabo el diagnóstico [29].

Es esencial considerar que una prueba serológica positiva no siempre indica la presencia del patógeno que provoca la enfermedad, sino que señala únicamente que el animal ha pasado por una infección. Esta diferencia resalta en comparación con las pruebas moleculares, donde un resultado positivo denota la presencia activa de la infección [30].

Varias investigaciones han demostrado que la producción de anticuerpos contra *E. canis* surgen aproximadamente entre los días 17 y 35 posteriores a la infección [31]. Por lo que un análisis serológico puede diagnosticar falsos positivos dependiendo del tiempo post infección, o retraso entre la infección y la detección de anticuerpos [32]. Una ventaja adicional del diagnóstico molecular es la habilidad para identificar los agentes incluso durante las primeras etapas de la enfermedad y en la fase subclínica. Esto posibilita la detección de animales portadores, incluso antes de que se desarrolle una

TABLA I

Alteraciones Hematológicas y relación con pruebas PCR y test de inmunocromatografía

Alteración Hematológica	PCR positiva (%)	PCR Negativa (%)	ICA Positivo (%)	ICA Negativa (%)
Anemia ¹	n = 8 (53,3)	n = 7 (46,6)	n = 16 (55,2)	n = 13 (44,8)
Trombocitopenia ²	n = 12 (80)	n = 3 (20)	n = 20 (69)	n = 9 (31)
Neutropenia ³	n = 4 (27)	n = 11 (73)	n = 2 (7)	n = 27 (93)
Neutrofilia ⁴	n = 3 (20)	n = 12 (80)	n = 4 (14)	n = 25 (86)
Linfocitosis ⁵	n = 3 (20)	n = 12 (80)	n = 5 (17)	n = 24 (83)
Linfopenia ⁶	n = 4 (27)	n = 11 (73)	n = 8 (28)	n = 21 (72)
Monocitosis ⁷	n = 3 (20)	n = 12 (80)	n = 2 (7)	n = 27 (93)
Monocitopenia ⁸	n = 1 (7)	n = 14 (93)	n = 4 (14)	n = 25 (86)

1: hematias < 5,5 × 10¹²·L⁻¹ | hematocrito < 37, 2: trombocitos < 150 × 10⁹·L⁻¹, 3: neutrófilos < 3 × 10⁹·L⁻¹, 4: neutrófilos > 12 × 10⁹·L⁻¹, 5: linfocitos > 4,8 × 10⁹·L⁻¹, 6: linfocitos < 1 × 10⁹·L⁻¹, 7: monocitos > 1,35 × 10⁹·L⁻¹, 8: linfocitos < 0,15 × 10⁹·L⁻¹, ICA: inmunocromatografía

respuesta inmune, permitiendo así iniciar el tratamiento antes de que se manifiesten signos clínicos [33].

En un contexto clínico, se sugiere que tras la aparición de los primeros indicios de EMC la utilización conjunta de pruebas serológicas y de PCR podría incrementar la probabilidad de obtener un diagnóstico preciso ya que no existe una prueba oro para el diagnóstico de patógenos transmitidos por *R. sanguineus* [32]. Estos hallazgos evidenciaron una disparidad en la concordancia entre las pruebas serológicas y los resultados de la PCR en la detección de *E. Canis*. Esto apunta a la posibilidad de obtener resultados falsos positivos o falsos negativos al depender exclusivamente de una única prueba.

Las irregularidades en los resultados de laboratorio son habituales en las infecciones provocadas por hemoparásitos; sin embargo, su presentación es muy diversa y carece de especificidad [34]. Las principales alteraciones hematológicas significativas encontradas en el diagnóstico serológico y molecular son anemia y trombocitopenia. Resultados congruentes a los encontrados en un estudio molecular de *E. canis* en India [35]. En este estudio las alteraciones de la serie blanca no fueron significativas, tanto para caninos positivos a la prueba molecular como serológica, estos hallazgos son compatibles a los encontrados por otra investigación [36]. Una posible explicación para que muchos de los perros positivos no hayan mostrado alteraciones en la serie blanca es que estos animales podrían haber estado en la fase subclínica de la enfermedad, donde la mayoría son asintomáticos y no presentan cambios hematológicos notables [37].

E. canis es reconocido como un patógeno exclusivo de los caninos; no obstante, existen informes que indican la posibilidad de transmisión zoonótica a seres humanos [20, 21]. Es crucial llevar a cabo análisis de rutina para diagnosticar la EMC en mascotas. Por lo tanto, realizar pruebas en perros para identificar estos patógenos es esencial para respaldar el cuidado de la salud de la población canina y, además, posibilita que los perros desempeñen un papel como centinelas de la salud humana [38]. El desarrollo de una técnica molecular para el diagnóstico de *E. canis* sería también aplicable en muestras sanguíneas de humanos.

CONCLUSIONES

Los resultados, basados en pruebas de PCR, revelan una tasa de positividad del 52 % en pacientes positivos a test ICA, lo que demuestra una disparidad entre las pruebas serológicas y de PCR lo que resalta la importancia de la combinación de ambos métodos para obtener un diagnóstico preciso en un contexto clínico. Se enfatiza que una prueba serológica positiva no garantiza la presencia activa del patógeno, en contraste con las pruebas moleculares. La producción de anticuerpos puede llevar a falsos positivos, subrayando la importancia de considerar el tiempo post infección.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Rol de los autores

SYVC: Análisis Formal, Investigación, Metodología, Redacción-revisión y edición. AEGL, LECT, RGSP, MNT: Análisis Formal, Investigación, Redacción-revisión y edición.

Los autores declaran que no violaron u omitieron normas éticas o legales en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro MH. Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. *J. Clin. Microbiol.* [Internet]. 2007;45(8):2716–2719. doi: <https://doi.org/bhpcj6>
- [2] Malik MI, Qamar M, Ain Q, Hussain MF, Dahmani M, Ayaz M, Mahmood AK, Davoust B, Shaikh RS, Iqbal F. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). *Vet. Med. Sci.* [Internet]. 2018; 4(2):126–132. doi: <https://doi.org/gmsjjs>
- [3] Bader J, Ramos RAN, Otranto D, Dantas-Torres F. Vector-borne pathogens in dogs from Guatemala, Central America. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* [Internet]. 2020; 22:100468. doi: <https://doi.org/m8rw>
- [4] Dantas-Torres F, Figueredo LA, Sales KGS, Miranda DEO, Alexandre JLA, Silva YY, Silva LG, Valle GR, Ribeiro VM, Otranto D, Deuster K, Pollmeier M, Altreuther G. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. *Parasit. Vectors.* [Internet]. 2020; 13(195). doi: <https://doi.org/m8sg>
- [5] Maggi RG, Krämer F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasit. Vectors.* [Internet]. 2019; 28; 12(145). doi: <https://doi.org/gmshs4>
- [6] Harrus S, Kass PH, Klement E, Waner T. Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.* [Internet]. 1997; 141(14):360–363. doi: <https://doi.org/d27nhg>
- [7] Badawi M, Qasim M, Al-Graibawi A, Khalaf J, Yousif A. First Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Ehrlichia canis* in Dogs from Baghdad, Iraq. *Arch. Razi Inst.* [Internet]. 2022; 77(6):2431–2437. doi: <https://doi.org/m8rx>
- [8] Asawapattanakul T, Pintapagung T, Piratae S, Juntautsa S, Chancharoen P. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, and interleukin-6 as inflammatory biomarkers in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. World.* [Internet]. 2021; 14(9):2325–2331. doi: <https://doi.org/m8rz>
- [9] Paula WV de F, Taques ÍGG, Miranda VC, Barreto ALG, Paula LGF de, Martins DB, Damasceno AD, Muñoz-Leal S, Sevá AP, Dantas-Torres F, Aguiar DM de, Krawczak FS. Seroprevalence and hematological abnormalities associated with *Ehrlichia canis* in dogs referred to a veterinary teaching hospital in central-western Brazil. *Ciênc. Rural.* [Internet]. 2022; 52(2):e20201131. doi: <https://doi.org/m8r2>
- [10] Holanda LC de, Almeida TLAC de, Mesquita RM de, Oliveira Júnior MB de, Oliveira AA de F. [Hematological Observations in The Blood and Bone Marrow of Dogs Naturally Infected by *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp.] *Ciênc. Anim. Bras.* [Internet]. 2019; 20:e-47686. doi: <https://doi.org/m8r3>
- [11] Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol* [Internet]. 2001; 51(6):2145–2165. doi: <https://doi.org/bvvgcn>

- [12] Franco-Zetina M, Adame-Gallegos J, Dzul-Rosado K. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Rev. Chil. Infectol.* [Internet]. 2019; 36(5):650-655. doi: <https://doi.org/m8r4>
- [13] Sánchez RO, Bazzano V, Felix ML, Armúa-Fernández MT, Venzal JM. Ehrlichiosis monocítica canina en la provincia de Entre Ríos, Argentina: Confirmación molecular de casos en la ciudad de Concordia. *FAVE Secc. Cienc. Vet.* [Internet]. 2020; 19(1):16-22. doi: <https://doi.org/m8s9>
- [14] Keysary A, Waner T, Strenger C, Harrus S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. *J. Vet. Diagn. Invest.* [Internet]. 2001; 13(6):521-523. doi: <https://doi.org/fp9bjn>
- [15] 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.* [Internet]. 2000; 12(3):240-244. doi: <https://doi.org/fdj6xs>
- [16] Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Dickmu VL, Fokam EB, Walker DH, McBride JW. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* [Internet]. 2005; 111(1-2):59-66. doi: <https://doi.org/ct4pmg>
- [17] McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Chinsangaram J, Akita GY, Osburn B. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* [Internet]. 1996; 8(4):441-447. doi: <https://doi.org/d25nn3>
- [18] Chalco-Torres LE, Guerrero-López AE, Sánchez-Prado RG, Pérez Rodríguez JE, Oliveira C, Gómez JA, Lenin-Aguilar F, Nirchio-Tursellino M. Detección molecular de coinfección por *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii* en un perro en Ecuador. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* [Internet]. 2023; 33(1):e33219. doi: <https://doi.org/m8r5>
- [19] Cabezas-Cruz A, Allain E, Ahmad AS, Saeed MA, Rashid I, Ashraf K, Yousfi L, Shehzad W, Indjein L, Rodríguez-Valle M, Estrada-Peña A, Obregón D, Jabbar A, Moutailler S. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.). *Parasit. Vectors.* [Internet]. 2019; 12(12). doi: <https://doi.org/grkfd2>
- [20] Arraga-Alvarado CM ; Quorollo BA ; Parra OC ; Berrueta MA; Hegarty BC ; Breitschwerdt EB. Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 2014; 91(6):1161-1165. doi: <https://doi.org/f6r8r9>
- [21] Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Quorollo BA, Saito TB, Maggi RG, Blanton LS, Bouyer DH. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit. Vectors.* [Internet]. 2014; 7(298). doi: <https://doi.org/f6g2xy>
- [22] Cañar-Romero PM, Vallecillo-Maza AJ, Castillo-Hidalgo EP. Detección de material genético mediante reacción en cadena de polimerasa en muestras de caninos seropositivos a *Ehrlichia canis*. *MQR Investig.* [Internet]. 2023; 7(2):1188-1200. doi: <https://doi.org/m8r6>
- [23] Happi AN, Toepp AJ, Ugwu CA, Petersen CA, Sykes JE. Detection and identification of blood-borne infections in dogs in Nigeria using light microscopy and the polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* [Internet]. 2018; 11:55-60. doi: <https://doi.org/m8r7>
- [24] Poolsawat N, Sangchuai S, Jaroensak T, Watthanadirek-Wijidwong A, Srionrod N, Minsakorn S, Tazawa K, Anuracpreeda P. Molecular occurrence and genetic diversity of *Ehrlichia canis* in naturally infected dogs from Thailand. *Sci. Rep.* [Internet]. 2023; 13(20394). doi: <https://doi.org/m8r8>
- [25] Pesapane R, Foley J, Thomas R, Castro LR. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from northern Colombia. *Vet. Microbiol.* [Internet]. 2019; 233:184-189. doi: <https://doi.org/m8r9>
- [26] Pérez-Macchi R, Pedrozo P, Bittencourt A, Müller A. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* [Internet]. 2019; 62:31-39. doi: <https://doi.org/m8sb>
- [27] McCown ME, Alleman A, Saylor KA, Chandrashekar R, Thatcher B, Tyrrell P, Stillman B, Beall M, Barbet AF. Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. *J. Spec. Oper. Med.* [Internet]. 2014; 14(4):81-85. doi: <https://doi.org/m8sb>
- [28] Vargas-Hernández G, André MR, Faria JLM, Munhoz TD, Hernandez-Rodriguez M, Machado RZ, Tinucci-Costa M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2012; 186(3-4):254-260. doi: <https://doi.org/bs6xdc>
- [29] McCown ME, Monterroso VH, Cardona W. Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. *CES Med. Vet. Zootec.* [Internet]. 2015 [consultado 18 Dic 2023]; 10(2):224-231. Disponible en: <https://goo.su/beCzk>
- [30] Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit. Vectors.* [Internet]. 2015; 8(75). doi: <https://doi.org/f7gzd7>
- [31] Gaunt SD, Beall MJ, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: Hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit. Vectors.* [Internet]. 2010; 3(33). doi: <https://doi.org/d4f3tr>
- [32] Lara B, Conan A, Thrall MA, Ketzis JK, Branford GC, Rajeev S. Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. *Pathogens.* [Internet]. 2020, 19; 9(6):488. doi: <https://doi.org/m8sc>
- [33] Standaert SMV, Yu T, Scott MA, Childs JE, Paddock CD, Nicholson WL, Singleton Jr. J, Blaser MJ. Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 2000; 181(3):1082-1088. doi: <https://doi.org/fcv9qd>
- [34] Harvey JW. *Anaplasma platys* infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). In: Greene CE, editors. *Infectious diseases of the dog and cat.* 4th ed. St. Louis (Missouri, EUA): Saunders Elsevier; 2012. p. 256-258.

- [35] Ratnalikar VM, Amruth Kumar VVV, Nagaraj P, Anil Kumar B, Satish Kumar K. Clinical findings and hemato biochemical alterations in dogs affected with *Ehrlichia canis*. Pharma Innov. J. [Internet]. 2022 [consultado 22 Dic. 2023]; 11(9):820-824. Disponible en: <https://goo.su/MbPuhsS>
- [36] Merino-Charrez O, Badillo-Moreno V, Loredo-Osti J, Barrios-García H, Carvajal-de-la-Fuente V. Detección molecular de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* y alteraciones hematológicas de perros infectados. Abanico Vet. [Internet]. 2021; 11:1-16. doi: <https://doi.org/m8sd>
- [37] Castro MB de, Machado RZ, Aquino LPCT de, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet. Parasitol. [Internet]. 2004, 119(1):73-86. doi: <https://doi.org/c6b6fp>
- [38] Jones EH, Hinckley AF, Hook SA, Meek JI, Backenson B, Kugeler KJ, Feldman KA. Pet ownership increases human risk of encountering ticks. Zoonoses Public Health. [Internet]. 2018; 65(1):74-79. doi: <https://doi.org/ggv6q5>