



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Problemática del diagnóstico de la ehrlichiosis monocitotrópica canina

Diagnosis troubles of canine monocytotropic ehrlichiosis

Autor/es

Sandra Ponsoda i Miralles

Director/es

María Carmen Simón Valencia

Facultad de Veterinaria

2017

---

# ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	3
Introducción.....	3
Justificación y objetivos.....	17
Metodología.....	17
Resultados y discusión.....	18
Conclusiones.....	25
Conclusions.....	25
Valoración personal.....	26
Bibliografía.....	26

## RESUMEN

La ehrlichiosis canina monocitotrópica (EMC) es una enfermedad bacteriana transmitida por garrapatas que produce una sintomatología muy variada. Por este motivo, su diagnóstico se basa en la anamnesis, en el cuadro clínico y en pruebas de laboratorio. En este trabajo se ha realizado un estudio retrospectivo de casos sospechosos de padecer EMC, provenientes del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza desde el año 2013 al 2016 en los que se les realizó al menos un test serológico para la detección de EMC. Para su valoración se realizó una revisión bibliográfica centrada, principalmente, en la información disponible sobre la interpretación de las pruebas diagnósticas. Las características clínicas, epidemiológicas y diagnósticas de cada caso recibido se introdujeron en una base de datos y, con la ayuda del programa Epi Info™, se ha hecho un análisis estadístico de la información buscando asociaciones entre diversos factores que puedan tener relación con la evolución de la enfermedad y el diagnóstico y el tratamiento.

## ABSTRACT

Monocytotropic canine ehrlichiosis (MCE) is a tick-borne bacterial disease that produces a very varied symptomatology. For this reason, its diagnosis is based on anamnesis, the clinical signs and laboratory tests. In this work, a retrospective analysis from suspicious MCE cases coming from the Veterinary Hospital of the University of Zaragoza have been compiled along the period of 2013 to 2016 in which at least one serological test was performed for the detection of MCE. A bibliographic review on the MCE has been made focusing mainly on the available information about the interpretation of the diagnostic tests. With this information a database has been made and, the Epi Info™ software was applied to carry on with the analysis of the information looking for associations between different clinical and epidemiological data and the progress of the disease, its diagnostic and treatment.

## INTRODUCCIÓN

El género *Ehrlichia* (familia Anaplasmataceae), está formado por bacterias intracelulares obligadas y Gram negativas. Se transmiten mediante garrapatas e infectan principalmente a leucocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos). Son cocobacilos pleomórficos de aproximadamente 0.5 µm de diámetro, aeróbicos y carecen de una vía glucolítica. Se encuentran en garrapatas y mamíferos, incluidos los seres humanos. *Ehrlichia* está compuesto por las especies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium* y *Ehrlichia muris*.

Esta revisión se centrará en *E. canis* por producir una alta morbilidad y mortalidad en perros. Tiene una distribución mundial y sus hospedadores vertebrados son algunos miembros de la familia Canidae. Es endémica en todos los países que bordean el Mediterráneo. El zorro, el coyote y el chacal, además del perro doméstico, se consideran hospedadores reservorio de la enfermedad. En España se ha encontrado en el zorro rojo (16,7%) mediante qPCR. En Italia se ha encontrado también en el lobo gris.<sup>1</sup>

El principal vector de esta bacteria es la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus* s.l.). Este artrópodo se alimenta preferentemente de sangre del perro en los tres estadios de su desarrollo. Hay transmisión transtadial pero no transovárica. La garrapata se infecta con *E. canis* ingiriendo sangre de algún perro afectado de ehrlichiosis sistémica y puede transmitir la infección a otros canes susceptibles durante, al menos, los 155 días siguientes.<sup>2</sup> Esta capacidad justifica que la mayoría de casos se produzcan en primavera (época con mayor actividad del vector), aunque también pueden aparecer casos en otras épocas del año debido al prolongado periodo subclínico en animales con infección crónica.

Los perros que son residentes o que viajan a zonas endémicas (las áreas con clima húmedo y cálido de Asia, África, Europa y América) son candidatos a infectarse y, por tanto, a sufrir la enfermedad.<sup>3</sup>

## **PATOGENIA**

Debido a la similitud entre *E. canis* y *E. chaffeensis* normalmente se asume que los descubrimientos sobre una especie se pueden aplicar a ambas.<sup>4</sup> De las dos especies, *E. chaffeensis* se ha estudiado más ampliamente por su importancia en la salud humana. Se han identificado proteínas en la superficie, probablemente adhesinas, de *E. chaffeensis* que posiblemente están involucradas en la fijación y entrada a la célula hospedadora.

El periodo de incubación de la ehrlichiosis canina es de 8 a 20 días. La bacteria se multiplica en macrófagos del sistema mononuclear fagocitario por fisión binaria y se disemina por todo el organismo. Todos los miembros de esta familia muestran dos formas morfológicamente distintas. La forma infecciosa extracelular (Cuerpo elemental, CE), que se une a las células para entrar por endocitosis y la forma intracelular, que se desarrolla en una vacuola derivada de la membrana celular en la que sobrevive y se replican. Ahí se diferencian en cuerpos reticulados (CR), que se dividen por fisión binaria y forman una amplia colonia, llamada mórula. Tras varios días se vuelve a diferenciar en CE para salir de la célula.<sup>5</sup> La replicación de *Ehrlichia* spp., en el perro tiene lugar en estas vacuolas que les protegen del sistema de vigilancia inmunitario del hospedador, de los lisosomas y de los reactivos intermediarios de oxígeno.

La persistencia de *E. canis* se debe a la evasión del sistema inmunitario del hospedador. Esto es posible gracias a las constantes alteraciones de los antígenos de superficie del microorganismo y a la expresión de diferentes variantes de proteínas. Otra característica que le permite evadir la respuesta inmunitaria es el hecho de carecer de peptidoglicanos y de lipopolisacáridos<sup>6</sup>, moléculas de la membrana externa que estimulan la respuesta inmunitaria innata. Al carecer de ellas se facilita la supervivencia intraleucocitaria debido a que se dificulta la detección de la bacteria por el sistema inmunitario del mamífero hospedador y del vector. La presencia de anemia hemolítica, la presencia de anticuerpos (Acs) anti-plaquetas e inmunocomplejos circulantes sugieren mecanismos inmunes en su patogenia.<sup>7</sup> Todavía no es bien comprendido el desarrollo de la hipocelularidad de la médula ósea en la fase crónica.

El periodo de incubación es seguido por 3 estadios consecutivos: agudo, subclínico y crónico. La fase aguda puede durar entre 1 y 4 semanas. Los perros que no han sido tratados o no se han tratado correctamente puede que se recuperen clínicamente pero entran en una fase subclínica, donde puede que la trombocitopenia sea la única alteración que se observe. Los perros en fase subclínica pueden permanecer como portadores asintomáticos durante meses e incluso años.<sup>8</sup> El bazo es el órgano más susceptible de alojar *E. canis* durante la fase subclínica y, probablemente, el último en albergarla antes de la eliminación. Perros persistentemente infectados pueden evolucionar a la curación o a la fase crónica que se caracteriza por la aparición de pancitopenia grave por hipoplasia de la médula ósea.<sup>9</sup> La muerte ocurre por hemorragias y/o infecciones secundarias.

Los cambios hematológicos en la ehrlichiosis canina se asocian a procesos inmunitarios e inflamatorios producidos por la infección. La trombocitopenia es la alteración más común en los casos de infección por *E. canis* y ocurre en todas las fases de la enfermedad. Se produce como resultado del secuestro esplénico, de la hipoplasia de médula ósea (característica de la fase crónica) y de la destrucción inmunomediada, y se acompaña de disfunción plaquetaria en perros infectados. Según la gravedad de la enfermedad puede aparecer anemia normocítica y normocrómica (más marcada en la fase crónica), que será regenerativa o no regenerativa según la causa (déficit de hierro por pérdida de sangre o hipoplasia de médula ósea, respectivamente).

Las cepas más virulentas de *E. canis* se asocian a niveles elevados del factor inhibidor de la migración plaquetaria (PMIF), ya que estos niveles están inversamente relacionados con el recuento de plaquetas en sangre.

A pesar de que los anticuerpos circulantes específicos frente a *E. canis* tienen una acción mínima en la infección intracelular y que, además, tienen un efecto perjudicial en la progresión de la enfermedad por las consecuencias inmunopatológicas, en numerosos perros infectados se detecta hipergammaglobulinemia.

Perros con gammapatía monoclonal pueden desarrollar hiperviscosidad con signos clínicos y lesiones asociados como la hemorragia subretiniana y desprendimiento de retina que deriva en ceguera aguda.<sup>7</sup>

### **CUADRO CLÍNICO**<sup>10</sup>

#### **Signos multisistémicos:**

Los signos característicos de esta enfermedad incluyen fiebre, depresión, letargia, anorexia, pérdida de peso y tendencia a hemorragias. Las hemorragias se observan normalmente en forma de petequias o equimosis en la piel. La epistaxis también es frecuente.

El examen clínico puede revelar linfadenomegalia y esplenomegalia en un 20% y 25% de los pacientes respectivamente.<sup>11</sup>

#### **Signos oculares:**

Los perros pueden mostrar cambios en el color o en la apariencia, o pueden desarrollar ceguera debido a la paraproteinemia, hipertensión sistémica, hifema, sangrado subretiniano y desprendimiento de retina.

Los hallazgos más comunes en la ehrlichiosis canina son la uveítis anterior y enfermedades de la retina (corioretinitis, edema de papila, hemorragia subretinal, infiltrados perivasculares de la retina y desprendimiento de retina).

#### **Signos neuromusculares:**

Los signos más frecuentes son las convulsiones, estupor, ataxia con disfunción neuronal motora superior o inferior, anisocoria, disfunción cerebelar, temblores e hiperestesia generalizada o localizada. Estos signos clínicos se deben a la meningitis y/o el sangrado de meninges. Excepcionalmente se ha encontrado mórulas en células presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

#### **Infecciones secundarias:**

Como la ehrlichiosis canina es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*, el cuadro clínico puede verse complicado por una coinfección con otros patógenos transmitidos por el mismo vector (*Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia rickettsii*, y *R. conorii*).

Además, perros con alteraciones inmunitarias producidas por la ehrlichiosis pueden sufrir infecciones secundarias por otros agentes oportunistas como bacterias, hongos y protozoos.

#### **Signos cardíacos:**

La ehrlichiosis canina en fase aguda puede producir daño miocárdico debido a que produce un aumento de la troponina cardiaca 1. En un caso también se observaron cambios en el electrocardiograma asociados a la infección por *E. canis*.<sup>12</sup>

## **HALLAZGOS PATOLÓGICOS**

Los hallazgos patológicos más importantes son petequias y hemorragias en la superficie mucosa y serosa de muchos órganos (cavidad nasal, pulmones, riñones, vejiga urinaria, tracto gastrointestinal y tejido subcutáneo).

Uno de los hallazgos histopatológicos más característicos es la infiltración perivascular de células plasmáticas en numerosos órganos. En el sistema nervioso central puede producirse una meningoencefalitis multifocal no supurativa. Los signos oculares implican casi todas las estructuras del ojo. Las alteraciones pulmonares en la ehrlichiosis consisten en una neumonía intersticial y puede haber hemorragias intersticiales y alveolares. En la fase aguda es frecuente observar linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia y hepatomegalia. La médula ósea muestra coloración roja e hiper celularidad en la fase aguda, pero en la fase crónica presenta hipoplasia y palidez causada por infiltración grasa. La afección del parénquima renal es poco frecuente, pero sí que se han hallado lesiones (glomerulonefritis grave, plasmocitosis intersticial renal y fusión de podocitos), principalmente por depósitos de inmunocomplejos.<sup>13</sup>

## **DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la ehrlichiosis se basa normalmente en una combinación de la anamnesis, de los signos clínicos y de las alteraciones en el hemograma y otras pruebas analíticas.

### **Diagnóstico analítico:**

El diagnóstico específico de la EMC puede hacerse con diferentes pruebas: demostración de las mórulas de *E. canis* en monocitos, cultivo de las rickettsias, serología y PCR.

La **hematología** es esencial para diagnosticar la EMC. En la fase aguda se observa trombocitopenia moderada a grave (en extensión sanguínea). Esta suele aparecer al décimo día (experimentalmente), y el valor más bajo ocurre hacia la tercera semana (20.000 a 52.000 plaquetas/ $\mu$ l). El volumen de plaquetas medio lleva una evolución inversa aumentando a partir del sexto día. Frecuentemente, la trombocitopenia de la fase aguda se acompaña de anemia ligera, normocítica, normocrómica y no regenerativa, y leve leucopenia.<sup>14</sup>

Otros posibles hallazgos de la hematología son hiperglobulinemia, neutropenia, disminución del hematocrito, de la concentración de hemoglobina y del volumen corpuscular medio, linfocitosis y monocitosis (estos dos últimos producidos por la estimulación crónica del sistema inmunitario). Las anormalidades más frecuentes en la **bioquímica** sanguínea se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características hematológicas y bioquímicas de las diferentes fases de la EMC**

		Fase aguda	Fase subclínica	Fase crónica
<b>Hematología</b>	Trombocitopenia	Moderada-grave	Leve	Grave
	Anemia	Leve	Leve	Grave
	Leucopenia	Leve	Leve	Grave
<b>Bioquímica</b>		Hipoalbuminemia Azotemia prerrenal		Hipoalbuminemia Azotemia renal Hiperproteïnemia Hiperglobulinemia Aumento ALT y PA

La plasmocitosis es frecuente y se puede confundir con mieloma, si bien en la EMC no suele observarse hipercalcemia ni lesiones líticas. Ocasionalmente, se observa linfocitosis granular (recuento absoluto de linfocitos entre 5.200 y 17.200 células/ $\mu$ l) que si coincide con gammapatía monoclonales pueden dar lugar a un diagnóstico erróneo de leucemia linfocítica.

Otros hallazgos en pruebas de laboratorio incluyen el aumento del tiempo de sangrado, patrón intersticial torácico variable (desde una leve infiltración lineal a una marcada infiltración intersticial con opacidades peribronquiales), hematuria y proteinuria. Existen indicadores pronósticos de supervivencia y predictores de mortalidad para la EMC (Tabla 2).



**Tabla 2. Indicadores pronósticos de supervivencia y mortalidad<sup>9</sup>**

<b>Indicadores pronósticos de Supervivencia</b>	<b>Predictores de Mortalidad</b>
Leucocitos totales > 5.8 x 10 <sup>3</sup> leucocitos/ $\mu$ l	Leucopenia severa
Hematocrito > 33.5%	Anemia severa
APTT < 14.5 segundos	Aumento de la APTT
Nivel de potasio > 4.75 mmol/l	HipoKalemia
Recuento de plaquetas > 89.5 x 10 <sup>3</sup> plaquetas/ $\mu$ l	
Probabilidad de supervivencia: <b>100%</b>	Probabilidad de muerte: <b>100%</b>

**APTT:** Tiempo Parcial de Tromboplastina activada

### **Citología:**

El diagnóstico de la ehrlichiosis canina puede hacerse mediante la demostración de la presencia de mórulas en monocitos en un frotis sanguíneo o en macrófagos de aspirados tisulares como de bazo, pulmón o ganglio linfático. Encontrar mórulas es difícil pero puede optimizarse la técnica realizando un frotis de la capa leucocitaria o mediante el frotis sanguíneo a partir de sangre extraída de los vasos marginales del pabellón auditivo. También se observan en macrófagos del líquido sinovial o más raramente en el LCR. Sin embargo, las plaquetas, los cuerpos linfoglandulares y el material fagocitado pueden confundirse con inclusiones de *E. canis*.<sup>14-16</sup>

### **Test serológicos:**

Se ha visto que perros clínicamente sanos presentaban títulos de anticuerpos en suero frente a *Ehrlichia* o *Anaplasma*. El clínico debe saber que es posible obtener un falso-positivo debido a reacciones cruzadas de *E. canis* con otras especies de rickettsias menos patógenas (*Ehrlichia ewingii*, *E. chaffeensis*, *Neorickettsia helminthoeca* y *N. risticii*) y con otros géneros (*Leishmania* y *Babesia*). Puede ser necesario el uso de pruebas como PCR, IFI e inmunoelectroforesis para confirmar la exposición o infección.<sup>14</sup>

**Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** es la prueba más usada y se considera la “prueba de oro” para detectar la exposición del perro a *E. canis*. No obstante, infecciones con otras especies del género *Ehrlichia* y, a veces, *Anaplasma* pueden dar resultados positivos en la prueba.

La detección de anticuerpos IgM no se recomienda debido a que otras infecciones rickettsiales también pueden elevar su nivel en sangre. Además, *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* poseen epítomos inmunogénicos similares dando lugar a reacciones cruzadas. La prueba IFI detecta anticuerpos IgG. Los anticuerpos IgG se pueden detectar desde los 7-10 días tras la aparición de la enfermedad, que podría ser

varias semanas tras haber tenido lugar la infección. En la Tabla 3 se muestra la interpretación de los títulos detectados mediante la técnica IFI.

**Tabla 3. Interpretación de los resultados según el título detectado con la técnica IFI<sup>14</sup>**

<b>Interpretación resultados</b>	<b>Título de anticuerpos</b>
Seronegativo	<1/40
Ligeramente positivo	Entre 1/40 y 1/80
Moderadamente positivo	Entre 1/160 y 1/320
Fuertemente positivo	≥1/640

La detección de IgG frente a *E. canis* mediante IFI con una titulación de 1/40 a 1/80 (dependiendo de las referencias del laboratorio), sugiere que el perro está o ha estado expuesto a la bacteria. La demostración de seroconversión positiva en una segunda muestra de suero obtenida de 7 a 14 días tras la primera (aumento de 4 veces el título de la primera muestra), indica infección aguda. Las IgG pueden persistir de meses a años tras la eliminación de la infección.<sup>14</sup>

El problema de la utilización de la IFI es la falta de estandarización entre los diferentes laboratorios debido a variaciones en el método de realización de la IFI, en la calidad y cantidad de antígeno de *E. canis* utilizado, que pueden dar lugar a resultados diferentes entre los laboratorios.

La interpretación de los resultados de la prueba IFI debe realizarse de acuerdo con el historial, los signos clínicos y los hallazgos analíticos. La presencia de anticuerpos IgG puede deberse únicamente a una exposición a *E. canis* en el pasado. Por otro lado, hay perros infectados por *E. canis* en los que se detectan anticuerpos que pueden manifestar signos clínicos de otra enfermedad, esto se puede observar en la fase subclínica de la EMC. La seroprevalencia de esta infección es elevada, numerosos perros clínicamente sanos son seropositivos a *E. canis*. Incluso en los casos en los que el tratamiento ha controlado la infección, el perro puede sufrir una enfermedad concurrente no relacionada-mientras persisten los anticuerpos frente a *E. canis*. Se trataría de diagnósticos positivos falsos, si solo se utiliza la serología. La repetición de la prueba IFI o realizar una PCR 1 o 2 semanas después puede ser útil en la interpretación de los resultados serológicos en estas circunstancias. No obstante, la seroconversión no se observa siempre en este intervalo de tiempo.<sup>14</sup>

Tras el tratamiento efectivo, el título de anticuerpos generalmente disminuye y acabarán desapareciendo. No obstante, puede ocurrir que se mantengan las alteraciones clínicas o hematológicas junto con la persistencia en el suero de anticuerpos reactivos frente a antígenos de *E. canis*. Se ha demostrado que la

titulación de anticuerpos en el suero después del inicio del tratamiento puede permanecer elevada durante unos 15 a 31 meses.<sup>17</sup> De hecho, en un estudio se vio que el 40% de los perros con ehrlichiosis canina tenía un elevado título de anticuerpos después de un año de haberse diagnosticado y tratado.<sup>18</sup>

**Test Inmuno-enzimáticos (ELISA y test rápidos inmunocromatográficos):** las pruebas inmunoenzimáticas pueden basarse en uno o varios antígenos y son muy usadas para la detección de anticuerpos frente a *E. canis*. Se ha identificado el péptido *p16*, que sirve para detectar anticuerpos específicos anti-*Ehrlichia canis* y puede usarse en estudios moleculares y serológicos.<sup>19</sup> Pueden ser cualitativas y semicuantitativas, y permiten obtener resultados rápidos en la clínica veterinaria. Los kits usados tienen elevada especificidad y sensibilidad, especialmente cuando el título de anticuerpos obtenido en una prueba IFI es mayor de 1/320. Para reducir el problema de sensibilidad de estas pruebas, se debe realizar un segundo diagnóstico 1-2 semanas después de la realización del primero.<sup>20</sup> Tienen la ventaja de su bajo coste y que evidencian la exposición a *E. canis*, permitiendo un diagnóstico temprano con el mínimo equipamiento y personal.

En el 2002 se hizo un estudio<sup>20</sup> en el que se comparaba la rMAP2-ELISA (proteína recombinante mayoritaria “2” como antígeno), Inmunocomb® (que utiliza cultivo directo de la rickettsia completa), y Snap®3Dx (que utiliza las proteínas p-30 y p-30-1 como antígenos) respecto a la prueba IFI en perros sospechosos de estar infectados naturalmente y en perros infectados experimentalmente. Al comparar los resultados cualitativos se observó una concordancia entre la prueba IFI y el test rMAP2-ELISA del 81% (54/67), con el test Inmunocomb® del 94%(63/67), y el test Snap®3Dx del 91% (61/67).

**Tabla 4. Sensibilidad y Especificidad de varios test inmunoenzimáticos respecto a la técnica IFI<sup>20</sup>**

Test	IFI < 1/320		IFI ≥ 1/320
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad
rMAP-ELISA	0.71	0.85	1.00
Inmunocomb®	0.86	0.98	1.00
Snap®3Dx	0.71	1.00	0.91

Con títulos IFI < 1:320, la sensibilidad desciende en todos los tests, por esta razón se recomienda realizar seroconversión repitiendo el test en 1-2 semanas.

**Inmunolectroforesis (IEF):** la IEF (Western Immunoblot) y la PCR se han usado para caracterizar y distinguir la infección de los organismos que causan la ehrlichiosis, la anaplasmosis o la neo-rickettsiosis y tienen la

capacidad de resolver los problemas relacionados con la inmunidad cruzada que se observan con pruebas serológicas habituales.

Desde el punto de vista clínico, la prueba IFI y las inmunoenzimáticas son las pruebas iniciales de cribado. Se ha demostrado que la IEF es útil diferenciando infecciones entre *E. canis* y *E. ewingii* ya que ambas dan resultado positivo en la prueba IFI frente a *E. canis*.<sup>21</sup> Y no se ha podido desarrollar la IFI de *E. ewingii* porque no se ha podido cultivar *in vitro*. Como alternativa se puede usar la PCR.

#### **Cultivo celular:**

Los cultivos de sangre pueden tardar de 4 a 10 semanas en mostrar crecimiento bacteriano dependiendo de la línea celular usada (la línea celular canina de macrófagos DH82 requiere 4 semanas)<sup>22</sup>, por lo que son poco prácticos en la clínica diaria. Es muy específico y por ello se considera una herramienta de investigación importante.

#### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

La técnica PCR y la secuenciación son métodos sensibles para detectar y caracterizar el ADN de *E. canis*. La sensibilidad de la PCR es mayor conforme la trombocitopenia aumenta. Se han desarrollado diferentes variantes y protocolos, buscando una mayor simplicidad y adecuadas sensibilidad y especificidad.

Se pueden amplificar diferentes genes (*16S rRNA*, *p28*, *p30*, *dsb*, *trp36*, *VirB9*, etc), pero los más usados son *16S rRNA* y *p30*. En la técnica de PCR anidada, el gen *p30* mejora la posibilidad de detectar *E. canis*. Se pueden utilizar muestras de sangre, médula ósea y bazo, si bien se considera más sensible ésta última.<sup>23</sup> En caso de no poder disponer de estas muestras, el suero podría ser la alternativa, pero la prueba debe repetirse 3 veces (usando la técnica de *16s rRNA* PCR-anidado) y la sensibilidad encontrada es del 63,1%.<sup>15</sup>

La técnica de PCR cuantitativa (qPCR), es más sensible que las técnicas convencionales, ya que permite cuantificar la carga bacteriana de la muestra. Es menos proclive a la contaminación y, si ocurre, es más fácil detectarla mediante análisis de la curva fusión, y permite establecer la cinética de la infección por Ehrlichia. Actualmente es la técnica preferida para diagnosticar infección por *E. canis*.<sup>14</sup> La construcción de “primers” quiméricos de ADN/RNA para el gen *16S rRNA* de *E. canis*, permiten aumentar 10 veces la sensibilidad de la qPCR gracias a la disminución de la formación de subproductos no deseados.<sup>24</sup> Otra ventaja de esta técnica es la posibilidad de detectar simultáneamente (multiplex-PCR), a los microorganismos que podrían coinfectar a los perros infestados con garrapatas (como *Ehrlichia ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum* y *A. platys*).<sup>14</sup> También se ha desarrollado para detectar *E. canis* y *Babesia canis vogeli*.<sup>25</sup>

La técnica qPCR con el sistema TaqMan con sondas específicas marcadas con fluorocromo, es más sensible. Se ha observado que puede detectar el ADN el 7º día post-infección (PI) en la infección experimental (IE) y

aumenta hasta 10 veces hasta el 10º y 12º día PI. Tras nueve días de tratamiento con doxicilina el ADN ya no se detectaba en sangre. Por otro lado, en la infección natural (IN) también se detecta al 7º día PI, pero la carga de ADN es significativamente inferior en los días 10º y 12º.<sup>26</sup>

La correlación entre resultados de la PCR realizada en muestras de sangre y la prueba IFI es muy baja, de hecho, en un estudio se vio con la prueba IFI que 10 de los 90 perros del estudio tenían anticuerpos frente a *E. canis* mientras que ninguno salió positivo con la prueba de PCR realizada en muestras de sangre.<sup>27</sup> Ya que el tejido o fluido correcto es importante para obtener un diagnóstico positivo mediante la amplificación del ADN de *Ehrlichia* spp siendo el bazo el órgano de elección. No se recomienda el análisis de conjuntiva porque en perros con IN da una sensibilidad del 60%.<sup>26</sup>

Un resultado negativo debe interpretarse como “no detección” del ADN específico, pero no implica que no haya ADN específico en la muestra (Falso negativo). También puede producirse un falso negativo por la dificultad de extraer el ADN del microorganismo, por problemas inherentes a la técnica y por selección de muestras inapropiadas. A pesar de que la qPCR ha mejorado la sensibilidad de la prueba en la detección de la infección en muestras de sangre, en particular para detectar la fase aguda, se recomienda realizarla junto con la serología. En el caso de la infección subclínica, es más recomendable la muestra de aspirado de bazo. Además, resulta útil para distinguir animales tratados con infección persistente de aquellos que han sido tratados con éxito pero al realizarles la prueba IFI presentan un título elevado de anticuerpos. La PCR y la secuenciación son pruebas muy específicas para determinar qué especie de rickettsia está infectando al animal.

Más recientemente se ha desarrollado una técnica PCR para su utilización en la clínica (**PCR-run**, de Biogal), sin necesidad de tener todo el aparataje que conlleva la realización en laboratorio. Se conoce como **LAMP** (del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*), se realiza a temperatura constante. Es una opción para países en vías de desarrollo. La **PCR-run** tiene especial interés en el diagnóstico de la ehrlichiosis canina en fase aguda ya que al compararla con la técnica qPCR en perros con infección experimental muestra una sensibilidad del 75% en esa fase, pero se reduce al 30% en el conjunto del estudio.<sup>28</sup>

## **TRATAMIENTO**

El tratamiento de la infección con *E. canis* consiste en el uso de antibacterianos y terapia de apoyo. Dentro de los fármacos eficaces se encuentran las tetraciclinas y rifampicina. El pronóstico de los perros con fase crónica es grave y, las consecuencias clínicas de las alteraciones hematológicas no se solucionan con doxicilina.

En un estudio realizado en 2004<sup>29</sup> sobre la sensibilidad de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* y *E. canis* a los antibióticos, se confirmó que, tal y como se muestra en la Tabla 5, los más eficaces son la doxiciclina y la rifampicina, mientras que la susceptibilidad a las fluoroquinolonas era muy variable ya que *A. phagocytophilum* era susceptible pero *E. chaffeensis* y *E. canis*, sólo parcialmente. Los  $\beta$ -lactámicos, cotrimoxazol, macrólidos y telitromicina no eran activos con ninguna de estas especies. El tianfenicol era más eficaz que el cloranfenicol. Se observó que estas especies tenían varios puntos de mutación en los genes *23S ARN*, que les confiere resistencia a los macrólidos.

**Tabla 5. Resultados de la evaluación de la sensibilidad a los antibióticos de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* y *E. canis*<sup>29</sup>**

Sensibilidad	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. chaffeensis</i>	<i>E. canis</i>
<b>Alta</b>	Doxiciclina; Rifampicina		
<b>Variable</b>	Fluoroquinolonas Tianfenicol	Tianfenicol	
<b>Parcial</b>	Cloranfenicol	Fluoroquinolonas, Cloranfenicol	
<b>No efectivo</b>	$\beta$ -lactámicos; Cotrimoxazol; Macrólidos; Telitromicina		

Generalmente, cuanto antes se inicie el tratamiento en perros con infección aguda mejor serán el pronóstico y los resultados. Los perros en fase crónica, generalmente no responden al tratamiento por las alteraciones multisistémicas producidas por la enfermedad y por la grave mielosupresión.

La doxiciclina es el tratamiento de elección a pesar de que la tetraciclina y la oxitetraciclina se usaban inicialmente y actualmente siguen siendo efectivas. Esto se debe a que la doxiciclina se absorbe rápidamente produciendo elevadas concentraciones del fármaco intracelulares, sanguíneas y tisulares, y su vida media es más prolongada con mayor penetración en el sistema nervioso central. Las ehrlichias puede persistir intracelularmente y la penetración intracelular del fármaco es fundamental para eliminar la infección. Por otro lado, la doxiciclina tiene propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias, que se han considerado como tratamiento coadyuvante en una infección patogenicia inmunopatológica, en gran medida.<sup>30</sup>

La pauta terapéutica utilizada más frecuentemente para el tratamiento de la fase aguda de la ehrlichiosis canina es doxiciclina vía oral durante 28 días (10mg/kg una vez al día), pauta recomendada por "Ehrlichia Consensus Statement from the Infectious Disease Study Group of the American College of Veterinary Internal Medicine"<sup>31</sup>. No obstante, en un estudio se ha visto que se podrían reducir el tratamiento a 16 días, pues a partir de ese día ya no se detectó ADN de *E. canis* en sangre ni en bazo mediante PCR.<sup>32</sup>

Además, coinfecciones experimentales con *E. platys* parecen responder bien administrando la misma posología que la usada para la infección con *E. canis*.<sup>33</sup> Parte de las diferencias entre la eficacia del tratamiento puede deberse al tiempo que el individuo llevaba infectado antes de iniciarlo. Los perros en fase crónica, tratados con doxiciclina durante 28 días, no responden bien. Tras el tratamiento, la PCR de la sangre sigue positiva, tanto en los perros infectados como en las garrapatas que se hayan alimentado de ellos. El tratamiento posterior con rifampicina oral ha reducido la tasa de infección en garrapatas que se alimentaban del perro, a pesar de que la rifampicina por sí sola no es efectiva.<sup>34</sup>

Tras 24 a 72 h de tratamiento con doxiciclina se observa la mejoría clínica (fase aguda o crónica leve), aunque los parámetros analíticos pueden estar alterados todavía. El recuento de plaquetas empieza a aumentar en este periodo y normalmente alcanza los niveles fisiológicos después de 10 a 14 días de tratamiento. Tras la eliminación de la infección con el tratamiento, la inmunidad no es permanente y los perros pueden volver a infectarse con *E. canis*.

La administración intramuscular de oxitetraciclina de larga duración se utiliza cuando la administración oral es complicada por signos gastrointestinales o neurológicos, o cuando se prevé un bajo cumplimiento de la pauta de administración de la oxitetraciclina.<sup>35</sup>

El cloranfenicol no está recomendado por el riesgo para la salud pública, la interferencia con la hematopoyesis y en médula ósea (no se debe usar en casos de anemia o pancitopenia). Únicamente se ha propuesto para el tratamiento de cachorros menores de 5 meses (evitar la coloración amarillenta de los dientes). Puede ser la alternativa para la infección persistente de *E. canis*, que no responde a la doxiciclina.

El dipropionato de imidocarb se ha usado para tratar infecciones con *E. canis*, pero su ineficacia in vitro (ciclos de 3 días) y en perros con IE. (6.6mg/kg, vía intramuscular, 2 inyecciones separadas en 2 semanas).<sup>36, 37</sup> Como la coinfección de *E. Canis* con *Babesia canis* y/o *Hepatozoon canis* (transmitidas por la garrapata) son frecuentes, se puede administrar dipropionato de imidocarb junto con tetraciclinas.

Junto a la terapia antimicrobiana, está justificada la terapia de coadyuvante con fluidos rehidratantes o transfusiones de sangre cuando el perro presenta una anemia grave. La transfusión de sangre no aumenta significativamente el número de plaquetas, y en situación de emergencia puede ser necesario el uso de plasma rico en plaquetas. También puede ser necesaria la administración de desmopresina en animales con hemorragias y una gran variedad de alteraciones de la coagulación con disfunción plaquetaria. En la fase crónica grave, se ha descrito un solo caso de curación en el que se utilizó factores de crecimiento hematopoyético (eritropoyetina humana recombinante, factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante), junto con el tratamiento con glucocorticoides y doxiciclina. Es un tratamiento largo y caro, y no se ha corroborado su eficacia.<sup>38</sup>

Los glucocorticoides a baja dosis inmunosupresora (1 a 2 mg/kg de prednisona vía oral, durante 2 a 7 días) en los primeros días del inicio del tratamiento y si presenta trombocitopenia grave, puede ser beneficioso. En casos de hemorragias también puede utilizarse al ayudar a reducir los trastornos trombocitopénicos primarios asociados a mecanismos inmunomediados.<sup>39</sup>

El seguimiento de la respuesta al tratamiento es importante porque *E. canis* puede persistir en el organismo durante meses o años y muchos perros pueden desarrollar la fase crónica de la enfermedad. La resolución de la trombocitopenia suele ocurrir entre los 10 y 14 días post-inicio del tratamiento, por lo que es una manera sencilla de comprobar la eficacia del tratamiento. Hay que evaluar el recuento de plaquetas de 1 a 3 meses después de haber acabado el tratamiento, pues la infección puede reactivarse después de haberlo finalizado.

Los cambios en las proteínas séricas producidos por la hiperglobulinemia pueden tardar 12 meses en normalizarse. Algunos perros normalizan todos los parámetros analíticos y los signos clínicos pero mantienen un elevado título de anticuerpos, en estos casos está justificado realizar una PCR del aspirado esplénico. La cuantificación molecular del ADN de *Ehrlichia canis* usando qPCR es sensible para el seguimiento de la eliminación infección.<sup>26</sup>

## **PROFILAXIS**

La ehrlichiosis canina, se transmite principalmente mediante la picadura de garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus* infectadas, por lo que la prevención de la enfermedad se centra en evitar el contacto entre dichas garrapatas y el hospedador susceptible.

Las medidas que pueden adoptarse pueden basarse en alejar al perro de áreas con abundancia del artrópodo como zonas boscosas o con mucha vegetación y, además, administrar productos que sean repelentes de garrapatas o que eliminen las ya presentes en el animal. De los productos disponibles como acaricidas o repelentes de garrapatas, cabe destacar las piretrinas-piretroides que matan rápidamente las garrapatas y tienen efecto repelente por contacto. Si el animal ya está infestado por garrapatas pueden usarse productos como el fipronil en forma de baño o pulverización para eliminarlas, pero en este caso puede que la garrapata ya haya transmitido *E. canis* al perro (se desconoce el tiempo necesario para transmitir la infección).

Otra posibilidad para prevenir la enfermedad sería el uso de vacunas vivas, aunque aún no se comercializan dichas vacunas; en un estudio <sup>40</sup> se evidenció que la cepa atenuada de *E. canis* puede servir para vacunar de forma eficaz y segura frente a la ehrlichiosis canina.



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La finalidad de este estudio es mostrar la problemática existente a la hora de diagnosticar la infección por *E. canis* utilizando las técnicas inmunocromatográficas rápidas (problemática que radica en que la fiabilidad de las pruebas no es del 100% y que los individuos infectados no resultan seropositivos inmediatamente tras la infección). Además, se harán algunas recomendaciones para que el tratamiento sea administrado con más precisión.

## METODOLOGÍA

Se ha realizado un estudio retrospectivo a partir de 73 perros atendidos en el Hospital Veterinario (HV) de la Universidad de Zaragoza desde el año 2013 al 2016 (Grupo A) a los que se les realizó al menos un test serológico y/o un segundo test serológico o por PCR en 7 perros (Grupo B) para detectar anticuerpos/ADN de *E. canis*. En este último grupo, la segunda prueba serológica se realizó 3 a 4 semanas tras la primera.

El grupo A estaba compuesto por 29 hembras y 44 machos. Estaba formado por 1 ejemplar de perro de aguas, pointer, pomerania, setter, shih-tzu, spaniel breton, bullmastiff, bull terrier, west Highland terrier, caniche, chihuahua, drahter, bichón maltés, galgo, mastín, chihuahua springer spaniel y sptiz alemán. Había 2 ejemplares de American Staffordshire terrier, beagle, braco alemán de pelo duro, pitbull, border collie, fox terrier, yorkshire y rottweiler. Tres ejemplares de schnauzer y labrador retriever. Había 4 ejemplares bóxer y cocker spaniel, y 5 ejemplares de golden retriever y bulldog francés. Nueve ejemplares eran pastores alemanes y 10 eran cruces de razas.

El Grupo B, que es una parte del grupo A, contenía 1 ejemplar de pitbull, chihuahua, braco alemán de pelo duro, schnauzer y de cruce de razas y 2 ejemplares de bulldog francés. En total había 3 hembras y 4 machos.

Se han recogido los datos de cada uno de estos animales (sexo, edad, tamaño, tipo de vivienda del animal, estado de salud del animal, sintomatología, evolución clínica, los resultados de la serología o de la PCR, si hubo seguimiento posterior en el HV, si se trató con doxiciclina y/u otros antibióticos, si mejoró tras el tratamiento con doxiciclina, si es probable que tuviera ehrlichiosis (por la suma de datos clínicos, resultado del test diagnóstico y evolución tras el tratamiento recibido).

Los factores mencionados se han dividido en categorías: edad (**cachorro** <1 año, **adulto** entre 1 y 6 años y **senior** ≥7 años), tamaño (**pequeño** <5kg, **mediano** entre 5 y 20kg y **grande** >20kg). Se han considerado dos tipos de vivienda: **piso en ciudad** o **vivienda en medio rural**. El tiempo de evolución de la enfermedad: **aguda** (de 1 a 30 días) y **crónica** (> 30 días). Según el estado de salud: **leve** (si no se compromete la vida del

animal ni altera su estado general), **moderada** (si puede llegar a comprometer la vida del animal y requiere tratamiento) y **grave** (si compromete la vida del animal y requiere tratamiento inmediato). El cuadro clínico se ha clasificado como **compatible** (se asemeja al que puede producir *E. canis*) o **no compatible** (cuando no se asemeja al esperado por esta infección). Para valorar si es **probable** que hubiera sufrido ehrlichiosis se ha tenido en cuenta la sintomatología inicial, el tratamiento administrado y su evolución clínica.

La prueba serológica utilizada en el diagnóstico es la técnica inmunocromatográfica semicuantitativa Inmunocomb® Canine Ehrlichia Antibodies test kit (Biogal Galed Laboratories). La técnica PCR cuantitativa, se realizó en un solo perro en la empresa ALQUIZVETK S.L., start-up de la Universidad de Zaragoza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis descriptivo:

En el Grupo A, el resultado de la serología fue de: 62 negativos (84.93%) y 11 positivos (15.07%). De los 73 perros, volvieron al HV 34 (46.58%) para su seguimiento, del resto se desconoce su evolución. El tratamiento con doxiciclina se administró a 30 perros (41.10%) y en 8 perros se desconoce este dato. De los 30 perros tratados, 10 (33.33%) mejoraron tras el tratamiento y en 12 (40.00%) se desconoce su evolución. A 23 perros (31.51%) de los 73 se les administró algún antibiótico diferente de la doxiciclina como la sulfamida o la clindamicina y en 9 perros (12.33%) se desconoce este dato. Y por último, de los 73 individuos, en 10 (13.7%) es muy probable que tuvieran ehrlichiosis canina, en 30 (41.09%) no es probable y en 33 (45.21%) se desconoce.

**Tabla 6. Frecuencia de llegada de los perros para el diagnóstico de infección por *E. canis* en relación con el Año y la Estación del año**

	Año de estudio		Estación del Año		
	Frecuencia	Porcentaje		Frecuencia	Porcentaje
<b>2013</b>	15	20.55%	<b>Otoño</b>	29	39.73%
<b>2014</b>	25	34.25%	<b>Invierno</b>	13	17.81%
<b>2015</b>	33	45.21%	<b>Primavera</b>	18	24.66%
			<b>Verano</b>	13	17.81%
<b>Total</b>	73	100.00%	<b>Total</b>	73	100.00%

En la Tabla 6 se observa cómo la frecuencia de diagnósticos de infección por *E. canis* ha ido en aumento progresivo cada año, por razones desconocidas, podría ser por un aumento del nº de mascotas en la

población, un aumento de la concienciación de los responsables de estos perros en cuanto a la prevención y cuidados de los animales, o cualquier otro factor difícil de deducir con los datos que disponemos. En cuanto a la Estación del año, como era esperable para una infección transmitida por garrapatas, parece que las estaciones más húmedas y templadas son las que han mostrado más alta frecuencia de diagnósticos. Esto es normal en nuestras latitudes, tal y como han descrito otros autores.<sup>41, 42</sup>

El Grupo B está formado por 6 adultos (85.71%) y 1 senior (14.29%). Dos de ellos eran de raza grande (28.57%), 3 medianos (42.86%), 1 pequeño (14.29%) y en 1 (14.29%) se desconoce este dato. La evolución clínica era aguda en 2 perros (28.57%), en el resto fue crónica (71.43%). Uno de los perros se encontraba en estado grave, y otro leve (14.29% respectivamente), el resto en estado moderado (71.43%). Dos de los perros vivían en piso (28.57%) y en el resto (71.43%) se desconoce este dato. En los 7 (100%) perros la sintomatología era compatible con una ehrlichiosis canina. Todos los resultados obtenidos en la primera prueba de los 6 perros a los que se les realizó la serología fueron “positivo”, y en la segunda serología que se les realizó a estos perros 3 semanas después de la primera el resultado fue positivo en 2 (33.33%) de los 6 perros. Al perro que se le realizó como prueba diagnóstica la PCR, el resultado fue positivo en ambas pruebas (separadas entre ellas por 6 meses). Todos los perros se trataron con doxiciclina y mejoraron con el tratamiento, pero a 4 (57.14%) de ellos se les administró, además de la doxiciclina, otro antibiótico como la clindamicina o la sulfamida. La suma de los datos clínicos y evolutivos indica que es muy probable que los 7 perros tuvieran ehrlichiosis canina.

De acuerdo con estos resultados, se podría decir que cuando la prueba serológica da resultado positivo, se podría considerar altamente fiable, tal y como otros autores han demostrado.<sup>20</sup> Si bien la sensibilidad y especificidad del test podría depender del título de Acs y del antígeno utilizado como base de la prueba. En este estudio, los perros habían sido diagnosticados mediante la técnica semicuantitativa, que utiliza cultivo directo de la rickettsia completa como base, y según el estudio realizado por Harrus *et al* (2002)<sup>20</sup> se le atribuye una Sensibilidad y Especificidad del 100% cuando los títulos de Acs son mayores de 1/320, aunque puede descender al 86% y 98%, respectivamente, si son inferiores.

### **Resultados del Análisis estadístico:**

Con el propósito de conocer la interacción entre factores intrínsecos, factores clínicos, epidemiológicos y diagnósticos de los perros que fueron analizados, se ha realizado el análisis estadístico del Grupo A completo, en la medida que el tamaño de la población de perros del estudio, lo ha permitido. En la Tabla 7 se muestran los resultados de la comparación de la raza, edad y sexo de los perros con la evolución del cuadro clínico que presentaban, en la Tabla 8 se relacionan con el estado clínico y en las Tablas 9 y 10 con el resultado de la serología y la probabilidad de sufrir EMC. No se ha encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa ( $p > 0,005$ ). Cabe destacar (Tabla 7), que el grupo de cachorros solo estaba

formado por 4 individuos, de modo que este resultado no es fiable, sin embargo, las razas medianas y grandes, los perros adultos y senior, y las hembras y machos tenían suficiente representación, pero los porcentajes encontrados son similares en estos factores. Al realizar el análisis eliminando el grupo de los cachorros, el resultado también muestra diferencias estadísticamente no significativas.

**Tabla 7. Análisis de factores intrínsecos de la población estudiada en relación con la evolución del Cuadro Clínico que presentan los perros en los que se hizo serología**

		Aguda		Crónica		Total (100,00%)	Porcentaje relativo del total
<b>Tamaño Raza</b>	<b>Grande</b>	17	48.65%	19	51.35%	37	61.67%
	<b>Mediano</b>	7	43.75%	9	56.25%	16	26.67%
	<b>Pequeño</b>	5	71.43%	2	28.57%	7	11.67%
<b>Total</b>		<b>30</b>	<b>50.00%</b>	<b>30</b>	<b>50.00%</b>	<b>60</b>	<b>100.00%</b>
<b>EDAD</b>	<b>Cachorro</b>	4	100.00%	0		4	5.88%
	<b>Adulto</b>	18	48.65%	19	51.35%	37	54.41%
	<b>Senior</b>	12	44.44%	15	55.56%	27	39.71%
<b>SEXO</b>	<b>Hembra</b>	13	46.43%	15	53.57%	28	41.18%
	<b>Macho</b>	21	52.50%	19	47.50%	40	58.82%
<b>Total</b>		<b>34</b>	<b>50.00%</b>	<b>34</b>	<b>50.00%</b>	<b>68</b>	<b>100.00%</b>

En la Tabla 8, aunque tampoco se han observado diferencias significativas entre la edad, el sexo y la raza con el estado clínico en el que llegaron los sospechosos de padecer EMC, a modo descriptivo, se puede decir que atendiendo al tamaño de la raza, las grandes tenían el más bajo porcentaje de formas graves y, sin contar con los de raza desconocida, en las pequeñas se observó el mayor porcentaje de formas moderadas, y en las razas medianas, de leves. En relación con la edad, sin considerar a los cachorros por su escaso número (n=4), los adultos tenían mayor porcentaje de formas moderadas y los senior el menor porcentaje de formas graves. Los porcentajes de casos graves, moderados y leves son muy parecidos en los machos y las hembras, aunque en éstas había menor porcentaje de casos graves.

**Tabla 8. Análisis de factores intrínsecos de la población estudiada en relación con el estado clínico que presentan los perros en los que se hizo serología**

		Grave	Leve	Moderado	Total (100,00%)	Porcentaje relativo del total
<b>RAZA</b>	<b>Desconocido</b>	1 12.50%	1 12.50%	6 75.00%	8	11.43%
	<b>Grande</b>	3 <b>8.11%</b>	13 35.14%	21 56.76%	37	52.86%
	<b>Mediano</b>	3 16.67%	7 38.89%	8 44.44%	18	25.71%
	<b>Pequeño</b>	1 14.29%	2 28.57%	4 <b>57.14%</b>	7	10.00%
<b>EDAD</b>	<b>Adulto</b>	5 13.51%	10 29.03%	22 <b>59.46%</b>	37	52.86%
	<b>Cachorros</b>	0	1 25.00%	3 75.00%	4	5.71%
	<b>Senior</b>	3 <b>10.34%</b>	12 41.38%	14 48.28%	29	41.43%
<b>SEXO</b>	<b>Hembra</b>	3 <b>8.00%</b>	9 36.00%	16 56.00%	28	40.00%
	<b>Macho</b>	5 13.16%	14 34.21%	23 52.63%	42	60.00%
<b>Total</b>		<b>8</b> 11.43%	<b>21</b> 32.86%	<b>39</b> 55.71%	<b>70</b>	100.00%

Igualmente, al analizar estos factores en relación al resultado de la serología (Tabla 9), no se han hallado diferencias significativas. Porcentualmente, las razas según su tamaño, y los machos y hembras muestran valores muy similares. En los grupos etarios, los adultos tenían el doble de porcentaje de resultados positivos que los senior, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

**Tabla 9. Análisis de factores intrínsecos de la población estudiada en relación con el resultado de la serología de *E. canis*.**

<b>Resultado del test serológico</b>						
<b>Factor</b>		<b>Negativo</b>		<b>Positivo</b>		<b>Porcentaje relativo del total</b>
		<b>Total (100,00%)</b>				
<b>RAZA</b>	<b>Desconocido</b>	6 75.00%	2 25.00%	8	10.96%	
	<b>Grande</b>	33 86.84%	5 13.16%	38	52.05%	
	<b>Mediano</b>	17 85.00%	3 15.00%	20	27.40%	
	<b>Pequeño</b>	6 85.71%	1 14.29%	7	9.59%	
<b>EDAD</b>	<b>Adulto</b>	31 79.49%	8 20.51%	39	53.42%	
	<b>Cachorro</b>	4 100.00%	0	4	5.48%	
	<b>Senior</b>	27 90.00%	3 10.00%	30	41.10%	
<b>SEXO</b>	<b>H</b>	25 86.21%	4 13.79%	29	39.73%	
	<b>M</b>	37 84.09%	7 15.91%	44	60.27%	
<b>TOTAL</b>		<b>62</b> 93.94%	<b>11</b> 6.06%	<b>73</b>	100.00%	

En la Tabla 10 se muestran los resultados del análisis respecto a la probabilidad de que padecieran EMC y, de nuevo, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias encontradas. Sin

considerar el grupo de razas desconocidas y el de pequeñas por su escaso número, porcentualmente, en el grupo de razas medianas hubo más posibles casos de EMC. Igualmente, sin considerar a los cachorros, dentro del grupo de adultos se detectaron un mayor porcentaje de posibles EMC. Sin embargo, entre macho y hembras los porcentajes son muy parecidos.

**Tabla 10. Análisis de análisis de factores intrínsecos de la población estudiada en relación con la probabilidad de que sufriera infección activa por *E. canis***

Probabilidad de Ehrlichiosis							
Factor		NO		SÍ		Total (100,00%)	Porcentaje relativo del total
<b>RAZA</b>	<b>Desconocida</b>	3	60.00%	2	40.00%	5	12.50%
	<b>Grande</b>	16	84.21%	3	15.79%	19	47.50%
	<b>Mediano</b>	8	72.73%	3	27.27	11	27.50%
	<b>Pequeño</b>	3	60.00%	2	40.00%	5	12.50%
<b>EDAD</b>	<b>Adulto</b>	18	69.23%	8	30.77%	26	65.00%
	<b>Cachorro</b>	1	100.0%	0		1	2.50%
	<b>Senior</b>	11	84.62%	2	15.38%	13	32.50%
<b>SEXO</b>	<b>Hembra</b>	12	80.00%	3	20.00%	15	37.50%
	<b>Macho</b>	18	72.00%	7	28.00%	25	62.50%
<b>TOTAL</b>		<b>30</b>	<b>75.00%</b>	<b>10</b>	<b>25.00%</b>	<b>40</b>	<b>100.00%</b>

Teniendo en cuenta todos los datos anteriores, se pone de manifiesto que la población de perros que ha llegado para ser diagnosticados de la infección por *E. canis* al HV de la Universidad de Zaragoza, no parecían tener un patrón de edad, sexo o raza, tanto en relación con la gravedad del cuadro, con la evolución clínica que manifestaban, con el resultado de la serología o con la probabilidad de padecer la EMC. En este sentido, se puede decir que estos resultados eran esperables ya que es una infección que depende de la infestación con garrapatas y hay otros muchos factores que podrían haber influido como son el acceso a áreas geográficas en las que las garrapatas se encuentren, las medidas de prevención contra estos parásitos por parte de los responsables de los perros e, incluso, la propia capacidad del animal para rechazar la infección con la respuesta inmune adecuada. Es conocido que las áreas que más favorecen la existencia de garrapatas son las que presentan climas húmedos y cálidos. Los países circunmediterráneos son endémicos por esta razón, los perros que habitan en esos ambientes en las épocas adecuadas (primavera y parte del otoño, principalmente), tendrán mayor probabilidad de infestarse con estos parásitos, aunque se considera que la infección también podría ocurrir en otras épocas del año.<sup>41-43</sup>

Uno de los datos epidemiológicos de los que disponíamos (no es frecuente conocer estos datos) que podían ser interesantes en relación con esta infección es el lugar de residencia del perro, para lo cual contábamos

con dos opciones: vivienda en piso de ciudad y en zona rural, partiendo de la idea de que en las zonas rurales los perros podrían ser más fácilmente parasitados por garrapatas.<sup>2,3</sup> En la Tabla 11 se observa la frecuencia de resultados de la serología en los perros según el tipo de vivienda y, esto mismo, en relación con la probabilidad de padecer EMC. Las diferencias de frecuencia observadas no son estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Esto, que aparentemente podría estar en contradicción con lo esperado, tiene una posible explicación ya que desconocemos el tipo de vida de estos perros, por qué lugares se mueven, si salen al campo con frecuencia, si son desparasitados habitualmente, etc. factores que, como se ha comentado anteriormente, pueden influir decisivamente en la posibilidad de adquirir la infección.<sup>3,43</sup>

**Tabla 11. Análisis de la relación entre el tipo de vivienda del perro analizado y el resultado de la serología**

	Serología	Negativo		Positivo		Total (100,00%)	Porcentaje relativo
<b>Tipo de Vivienda</b>	<b>Piso Z</b>	27	90.00%	3	10.00%	30	62.50%
	<b>Rural</b>	16	88.89%	2	11.11%	18	37.50%
<b>TOTAL</b>		<b>43</b>	<b>89.58%</b>	<b>3</b>	<b>10.42%</b>	<b>48</b>	<b>100.00%</b>
	Probable EMC	NO		SÍ		Total (100,00%)	Porcentaje relativo
<b>Tipo de Vivienda</b>	<b>Piso Z</b>	11	78.57%	3	21.43%	14	70.00%
	<b>Rural</b>	5	83.33%	1	16.67%	6	30.00%
<b>TOTAL</b>		<b>16</b>	<b>89.58%</b>	<b>4</b>	<b>10.42%</b>	<b>20</b>	<b>100.00%</b>

Es bien conocido que la EMC es una enfermedad difícil de diferenciar clínicamente, debido a la gran variedad de cuadros clínicos que puede presentar asociados a ella.<sup>10</sup> En la población canina objeto de estudio (Tabla 12), se observa que los 11 perros que no tenían sintomatología compatible (100%) realmente no padecían la enfermedad, pero en sentido contrario, había 19 perros (65.52%) en los que se consideró que tenían una sintomatología compatible con la EMC y al seguir su evolución posterior se vio que no era probable que padecieran dicha enfermedad. Sin embargo, vemos que el resultado de serología negativa y la posibilidad de que no padecieran EMC, coincidían en un 96.77% de los perros en los que este dato se pudo deducir. Desde un punto de vista práctico, de cara a la clínica diaria, estos resultados confirman lo ya observado por otros autores en los que la serología negativa tiene una alta fiabilidad para diagnosticar los casos negativos, pero aun así se puede esperar fallos, como se aprecia en la Tabla 12, ya que 1 de los 31 perros con serología negativa (3.23%) es muy probable que realmente padeciera EMC. Considerando la “Probabilidad de sufrieran EMC”, como “Enfermos reales en este estudio” (Tabla 12), se puede evaluar la Sensibilidad en un 90% (9/10) y la Especificidad en un 100% (30/30), esto implica un VPP (valor predictivo positivo) del 100% (9/9) y un VPN (valor predictivo negativo) del 96.77% (30/31). Esto ha sido observado por otros autores, ya que es fácil

que en las primeras fases de la infección aguda no se detecten tasas bajas de Acs, de ahí la recomendación de repetir la prueba tras 1-2 semanas de la primera.<sup>20</sup>

Otro de los aspectos importantes de la serología es que permite seguir la evolución tras el tratamiento, esto se realizó en el Grupo B ya que de los 6 seropositivos, al volver tras 3 semanas de tratamiento, solo 2 seguían seropositivos. El seguimiento de la respuesta al tratamiento es importante porque *E. canis* puede persistir en el organismo durante meses o años, y muchos perros podrían desarrollar la fase crónica de la enfermedad o bien convertirse en reservorios de esta infección.<sup>38</sup>

**Tabla 12. Relación de los resultados de la serología y el cuadro clínico observado, con la probabilidad de que se trate de EMC**

		Probabilidad de Ehrlichiosis				
		SÍ	NO	Total (100,00%)	Procentaje relativo del total	
<b>Resultado serología</b>	<b>Positivo</b>	9 100.00%	0	2	6.06%	
	<b>Negativo</b>	1 3.23%	30 96.77%	31	93.94%	
<b>Sintomatología compatible</b>	<b>SÍ</b>	10 34.48%	19 65.52%	29	72.50%	
	<b>No</b>	0	11 100.00%	11	27.50%	
<b>total</b>		10 25	30 75	40	100.00%	

Un apartado importante de estudio consiste en valorar si la implantación del tratamiento con doxiciclina (DX), que es el antibiótico de elección en la EMC, fue acertado en relación a la existencia de la infección. En la Tabla 13, se puede observar que de 54 perros en los que la serología fue negativa, en 21 se implantó el tratamiento con DX (38.89%), por otro lado, hubo un 61.11% de los seronegativos a los que no se les administró DX. Si comparamos con los resultados al relacionar el tratamiento con DX y la probabilidad de que se tratase de EMC, se observa que en 9 de los tratados la evolución posterior ponía de manifiesto que muy probablemente no se trataba de EMC (47.37%; 9/19), esto significa que en un 42.86% de los perros (9/21) se realizó el tratamiento con DX sin necesitarlo, al menos para hacer frente a ésta infección.

Este dato respalda el hecho de que se tiende a administrar la doxiciclina con demasiada frecuencia sin valorar detenidamente si realmente es necesaria o se podría evitar su uso porque, aunque no hay evidencias de que *E. canis* haya desarrollado resistencia a la doxiciclina, éste es un antibiótico que se utiliza para tratar numerosas infecciones, tales como las debidas a *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycoplasmas*, *Bordetella*, *Chlamydia*, otras Rickettsias, *Leptospira*, *Borrelia*, *Clostridium*, *Mycobacterium avium*, *Entamoeba*, *Balantidium*, *Coccidia*, *Toxoplasma*, etc., y el uso no justificado de este antibiótico podría favorecer la aparición de resistencias en otros grupos de microorganismos.



**Tabla 13. Relación entre la implantación del tratamiento con doxiciclina, el resultado del diagnóstico serológico y la probabilidad de que se tratase de EMC**

Resultado del test serológico							
		Negativo		Positivo		Total	Porcentaje relativo
Tratado con DX	No	33	61.11%	1	9.09%	34	52.31%
	Si	21	38.89%	10	90.91%	31	47.69%
Total		54	83.08%	11	16.92%	65	100.00%
Probabilidad de Ehrlichiosis							
		NO		SÍ		Total (100,00%)	Porcentaje relativo
Tratado con DX	Desconocido	3	100.00%	0		3	9.09%
	No	18	100.00%	0		18	54.55%
	Si	9	47.37%	10	52.63%%	19	36.36%
Total		30	75.00%	10	25.00%	40	100.00%

En el Grupo B se ha seguido la misma dinámica que en el primero y las conclusiones obtenidas son similares. Solo destacar que en este caso, en los 7 perros era muy probable que padecieran EMC y el primer resultado obtenido mediante serología de los 6 (100%) fue positivo (el séptimo se diagnosticó mediante PCR). Con este dato y con el obtenido en los perros del primer grupo, se podría decir que en nuestra población la serología tiene una fiabilidad elevada (como solo se realizó PCR en un caso, no se dispone de datos suficientes para valorar su fiabilidad). Como en este grupo todos sufrían ehrlichiosis, el tratamiento con doxiciclina fue acertado en los 7 perros (100%) y todos mejoraron.

## CONCLUSIONES

La prueba inmunocromatográfica rápida es una herramienta muy útil para el diagnóstico de la infección por *E. canis* en la clínica si se sabe analizar bien el resultado (su fiabilidad es variable).

Antes de decidir el tratamiento con doxiciclina en un perro seronegativo con sintomatología y/o hematología compatible con EMC, es completamente necesario realizar la repetición de la serología transcurridas 1 a 2 semanas después de la primera. Únicamente los individuos seropositivos y los que se encuentren en estado grave (aunque sean seronegativos) deberían ser tratados con doxiciclina.

## CONCLUSIONS

The immunochromatographic test is a very useful tool for the diagnosis of *E. canis* infection in the clinic if it is well known to analyze the result (its reliability is variable).

Before deciding the treatment with doxycycline in a seronegative dog with symptoms compatible with EMC, it is recommended to repeat the serology 1 to 2 weeks after the first. Only seropositive individuals and those found to be in serious condition, although these last had been diagnosed as seronegative, should be treated with doxycycline.

## VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha sido de gran ayuda para ampliar mis conocimientos sobre las pruebas diagnósticas de la EMC y para aplicar los conocimientos adquiridos a lo largo del grado sobre el análisis de datos. También me ha servido para ver la importancia de no basar el diagnóstico únicamente en un solo resultado de laboratorio, ya que hay que tener en cuenta toda la información de la que dispongamos y aplicar las herramientas que tengamos a nuestro alcance correctamente para poder llegar al diagnóstico definitivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Santoro M, Veneziano V, D'Alessio N, Di Prisco F, Lucibelli MG, Borriello G *et al.* Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Coxiella burnetii* infections in wild mammals of southern Italy. *Parasitology Research*, 2016; 115: 4427-4431.
2. Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, 1975; 36: 937-940.
3. Mason RJ, Lee JM, Curran JM, Moss A, Van Der Heide B, Daniels PW. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centers of northern Australia. *Australian Veterinary Journal*, 2001; 79: 559-562.
4. Mavromatis K, Doyle CK, Lykidis A, Ivanona N, Francino MP, Chain P *et al.* The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of Bacteriology*, 2006; 188: 4015-4023.
5. Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2009; 7: 709-722.
6. Lin M, Rikihisa Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*, 2003; 71: 5324-5331.
7. Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AWCA. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 2001; 95: 1-15.
8. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36: 73-76.
9. Shipov A, Klement E, Reuveni-Tager L, Waner T, Harrus S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 2008; 153: 131-138.

10. Harrus S, Waner T, Neer TM. Ehrlichia canis infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. Greene C. Elsevier. 2011.
11. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 1991; 21: 75-98.
12. Waner T, Ohad D. Apparent atrial parasystole associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Israel Journal Veterinary Medicine*, 2008; 63: 116-121.
13. Codner EC, Caceci T, Saunders GK, Smith CA, Robertson JL, Martin RA *et al.* Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 1992; 53: 2286-2291.
14. Harrus S, Waner. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, 2011; 187: 292-296.
15. Mylonakis ME, Koutinas AF, Billins C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O *et al.* Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 2003; 91: 197-204.
16. Mylonakis ME, Borjesson DL, Leontides L, Siarkou VI, Theodorou K, Koutinas AF. Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 2011; 40: 78-83.
17. Perille AL, Matus RE. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1991; 5: 195-198.
18. Bartsch RC, Greene RT. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1996; 10: 271-274.
19. Quorollo BA, Chandrashekar R, Hegarty BC, Beall MJ, Stillman B, Liu J *et al.* A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infection Ecology & Epidemiology*, 2014; 4: 24699.
20. 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*. *Veterinary Microbiology*, 2002; 86: 361-368.
21. Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC, Siregar AG, Pasaribu FH, Malole MB. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; 30: 143-148.
22. Alves RN, Rieck SE, Ueira-Vieira C, Labruna MB, Beletti ME. Isolation, *in vitro* propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an *Ehrlichia canis* strain from southeastern Brazil. *Journal of Veterinary Science*, 2014; 15: 241-248.

23. Faria JL, Dagnone AS, Munhoz TD, João CF, Pereira WA, Machado RZ *et al.* *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2010; 19: 98-102.
24. Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. Use of chimeric DNA-RNA primers in quantitative PCR for detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009; 75: 6393-6398.
25. Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 2010; 173: 292-299.
26. Baneth G, Harrus S, Ohnona FS, Schlesinger Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136: 321-325.
27. Seaman RL, Kania SA, Hegarty BC, Legendre AM, Breitschwerdt EB. 2004. Comparison of results for serologic testing and a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 2004; 65: 1200-1203.
28. Waner T, Nachum-Biala Y, Harrus S. Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. *The veterinary journal*, 2014; 202: 618-621.
29. Branger S, Rolain JM, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004; 48: 4822-4828.
30. Villaescusa A, García-Sancho M, Rodríguez-Franco F, Tesouro MÁ, Sainz Á. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *The Veterinary Journal*, 2015; 204: 263-268.
31. 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. *Journal of veterinary internal medicine*. 2002; 16: 309-315.
32. Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 2004; 48: 4488-4490.
33. Gaunt SD, Beall MU, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrashekar E *et al.* Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*, 2010; 3: 33.

34. McClure JC, Crothers ML, Schaefer JJ, Stanley PD, Needham GR, Ewing SA *et al.* Efficacy of doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010; 54: 5012-5020.
35. Kikvi GM, Mitema ES, Buoro IJB. The pharmacokinetics of a long-acting oxytetracycline formulation in healthy dogs and in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications*, 2001; 25: 391-400.
36. Bressler C, Himes LC, Moreau RE. Portal vein and aortic thromboses in a Siberian husky with ehrlichiosis and hypothyroidism. *Journal of Small Animal Practice*, 2003; 44: 408-410.
37. Eddlestone SM, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Gill A, Hosgood *et al.* Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2006; 20: 840-844
38. Harrus S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The veterinary Journal*, 2015; 204: 239-240.
39. Harrus S, Waner T, Eldor A, Zwang E, Bark H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Record*, 1996; 139: 290-293.
40. Rudoler N, Baneth G, Eyal O, Straten M, Harrus S. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 2012; 31: 226-233.
41. Cardoso L, Tuna J, Vieira L, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Veterinary Journal*, 2010; 183: 322-323.
42. Solano-Gallego L, Trotta M, Razia L, Furlanello T, Caldin M. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006; 1078: 515-518
43. Estrada-Peña A, Roura X, Sainz A, Miró G, Solano-Gallego L. Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey. *Ticks and tick-borne diseases*, 2017; 8: 443-452