



4

Ehrlichiosis canina y su contextualización en Colombia

Adriana Patricia López Romero¹ y Diego Soler-Tovar²

Resumen

La Ehrlichiosis Monocítica Canina hace parte de las enfermedades transmitidas por garrapatas, su distribución es mundial y cuenta con un alto índice de diagnóstico en algunas zonas de Colombia. El presente capítulo pretende guiar al lector por los aspectos más relevantes de la enfermedad como son: historia, etiología, distribución geográfica, métodos diagnósticos y su uso e interpretación en las diferentes fases de la enfermedad y avances en investigación entre otra información considerada relevante. De igual forma, busca incentivar a los investigadores a profundizar en las nuevas técnicas de diagnóstico e identificación de la enfermedad así como a incursionar en nuevos aspectos relevantes como los planteados en el subtema perspectivas de investigación.

Palabras clave: *E. canis*, Ehrlichiosis, diagnóstico, investigación, caninos.

-
1. MV, MSc. Facultad de Ciencias Agrarias, Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Bogotá, Colombia. Correo: lopez.adriana1@uniagraria.edu.co
 2. MV, MSc. Grupo Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia. Correo: diegosoler@unisalle.edu.co

Introducción

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) hace parte de las enfermedades transmitidas por garrapatas o TBD (*Tick borne diseases*, por sus siglas en inglés). Es una enfermedad multisistémica causada por el patógeno *E. canis*, puede afectar a caninos de todas las razas (1) y no presenta predilección de edad o género (2). La patogénesis de la enfermedad inicia tras la fase de infección que tiene un período de incubación de 8 a 20 días, se puede manifestar de tres formas: aguda, subaguda y crónica; la fase aguda puede durar de 1 a 4 semanas y las otras fases desde meses hasta años.

Esta enfermedad se ha caracterizado como un problema emergente en el mundo debido a la alta morbilidad y a su relevancia zoonótica dado que los perros pueden actuar como transmisores del vector a humanos (3).

Los patógenos transmitidos por artrópodos son una constante preocupación tanto para la medicina veterinaria como para la humana ya que el cambio climático ha cambiado los hábitats del mundo (4). La Ehrlichiosis canina de diagnóstico frecuente en zonas tropicales toma mayor relevancia en nuestro contexto, por lo cual este capítulo recopila los aspectos más relevantes de la enfermedad, su historia, presentación e investigaciones en Colombia y los desafíos en investigación que se proyectan tanto en caracterización como en diagnóstico.

Etiología (evolución de la clasificación taxonómica)

El agente etiológico de la Ehrlichiosis es una bacteria intracelular obligatoria Gram-negativa cocoide, que requiere de un mamífero como reservorio y de un artrópodo como vector. Este microorganismo tiene tropismo por leucocitos y plaquetas de animales y humanos (5), invade el citoplasma alojándose dentro de vacuolas donde se multiplica por fisión binaria, originando un agregado de las bacterias o microcolonia denominadas “mórulas” (6).

Las bacterias son pequeñas (0.2 a 0.5 μm), se tiñen débilmente con la tinción de Gram y permanecen en la vacuola fagocítica después de entrar a la



célula impidiendo la fusión de los lisosomas por inhibición de la expresión de receptores en la superficie de dicha vacuola (7). La pared celular de *Ehrlichia* y *Anaplasma* es semejante a las bacterias gram negativas, carece de peptidoglicanos y lipopolisacáridos (LPS). Las diferentes especies de estos géneros comparten diversos antígenos proteicos, por ende son frecuentes las reacciones cruzadas en las pruebas serológicas de detección de anticuerpos (7).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *E. canis*.

Reino	Bacteria
Subreino	Negibacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Género	<i>Ehrlichia</i>
Especie	<i>Ehrlichia canis</i>
	(TSN* 961426)

*TSN: Taxonomic Serial No (Número serial taxonómico).

Fuente: modificado del Integrated Taxonomic Information System, 2018.

Estas bacterias fueron descritas por primera vez en caninos por Donatien y Letosquard en 1935 en Argelia, posteriormente la enfermedad fue atribuida a una infección de caninos que causó la muerte de militares en contacto con perros de la raza Pastor Alemán durante la Guerra de Vietnam (8).



La clasificación taxonómica (tabla 1) de este microorganismo ha tenido variaciones en el tiempo debido a las nuevas técnicas de diagnóstico. Inicialmente el género incluía 10 especies clasificadas con base en el tipo de célula parasitada en el huésped: *E. canis*, *E. risticii* y *E. sennetsu* que parasitan monocitos, *E. ewingii*, *E. equi* y *E. phagocytophila* parasitando granulocitos y *E. platys* en los trombocitos. Esta categorización fue modificada a partir del análisis de las secuencias del gen 16S del rRNA, el operón groESL y genes que codifican para proteínas de superficie generando la conformación de cinco especies: *E. canis* (agente causal de Ehrlichiosis Monocítica Canina),

E. chaffeensis (agente causal de Ehrlichiosis Monocítica Humana), *E. ewingii* (agente causal de Ehrlichiosis Granulocítica Canina y Humana), *E. muris* y *E. ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*). El género *Ehrlichia* pertenece a la Familia Anaplasmataceae del orden de Rickettsiales (9), donde los agentes restantes de la organización anterior fueron reclasificados en los géneros *Anaplasma* y *Neorickettsia* de la siguiente manera: en el género *Anaplasma* se relacionan *Anaplasma platys* (anteriormente *E. platys*) y *A. phagocytophilum* (combinación de los organismos conocidos como *E. equi* y *E. phagocytophila*, agente causal de Ehrlichiosis Granulocítica Equina y Humana). En el género *Neorickettsia* se encuentran *N. helminthoeca*, *N. risticii* (anteriormente *E. risticii*) y *N. sennetsu* (anteriormente *E. sennetsu*). Actualmente, basados en el análisis de la secuencia genética del gen 16S del rARN y el operón *groESL* y reforzado por características biológicas y antigénicas, se ha presentado una nueva reorganización de los miembros de la familia Ehrlichieae (9) por lo que los cinco patógenos de humanos descritos de esta bacteria se encuentran incluidos en tres de los cuatro géneros (genogrupos) que conforman la familia Anaplasmataceae (6).

Vector

Las TBD en caninos son relevantes en la práctica veterinaria ya que los vectores tienen distribución mundial. Las diferentes especies de garrapatas son vectores potenciales de organismos patógenos como espiroquetas, rickettsias, babesias y ehrlichias, entre otros.

Actualmente se conoce como vector para la transmisión de *E. canis* a la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, considerándose como la garrapata de mayor distribución mundial, se cree que es originaria de África y se encuentra principalmente en el trópico donde se desarrolla durante todo el año. En países que presentan estaciones predomina en otoño y primavera cuando las temperaturas son óptimas para su desarrollo. Afecta a diferentes mamíferos entre ellos a bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, roedores y humanos, y puede llegar a afectar algunos reptiles y aves, sin embargo afecta principalmente a los caninos (10).




Distribución geográfica (mundial y nacional)

Las garrapatas son portadoras de agentes patógenos que pueden transmitir enfermedades tanto a humanos como a una gran variedad de animales. Se han descrito más de 893 especies de garrapatas en todo el mundo, las cuales se encuentran divididas en tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas) y Nuttalliellidae; las dos primeras distribuidas en todas las regiones zoogeográficas y la última solo en suráfrica. Del grupo Ixodidae se conocen por lo menos 58 especies de garrapatas a nivel mundial, considerándose a *R. Sanguineus* como el principal parásito del perro perteneciente a este grupo (11,12). Sin embargo, hoy en día esta especie está siendo nuevamente descrita y caracterizada con base en diagnósticos moleculares (13).

La presencia de *E. canis* ha sido descrita en la mayoría de los países (14,15). En Colombia se ha reportado Ehrlichiosis Canina desde hace más de 30 años (16) mediante detección del agente o la evidencia de contacto (ver figura 1) en ciudades y regiones como: Montería (Córdoba) donde se comprobó la enfermedad en 20 de 74 perros sospechosos utilizando la técnica de capa sanguínea blanca teñida con Wright (17); Cali (Valle del Cauca) con un reporte de seropositividad contra *E. canis* del 49.5% de 101 perros evaluados mediante la técnica de ELISA (18); Villeta (Cundinamarca) donde se encontró una seropositividad contra *Ehrlichia* spp. en 31.8% de los caninos evaluados (19); piedemonte casanareño donde se detectó la presencia de *E. canis* en un canino de 31 evaluados (20); Cartagena y Barranquilla 31.1% (21), con seroreactividad del 31.8% en el área rural y 31.7% en el área urbana (19); Ibagué con una seroprevalencia del 31.6% (22); Barranquilla con una seropositividad de 74% (23); Medellín con frecuencias de positividad a *Ehrlichia* sp. del 11.2% en pacientes sintomáticos a través de herramientas moleculares (24); Villavicencio, Bogotá y Bucaramanga con el 40.6% de positividad por PCR de 91 caninos sintomáticos muestreados (25) e Ibagué con un 63% de positivos mediante PCR (26).

Entre los estudios realizados a nivel nacional cabe resaltar hallazgos como el de la ciudad de Cali en el cual determinaron que su entorno agroecológico



reúne las condiciones medioambientales óptimas para la presentación de Ehrlichiosis Monocítica Canina, favorecido además por las altas infestaciones de garrapatas.

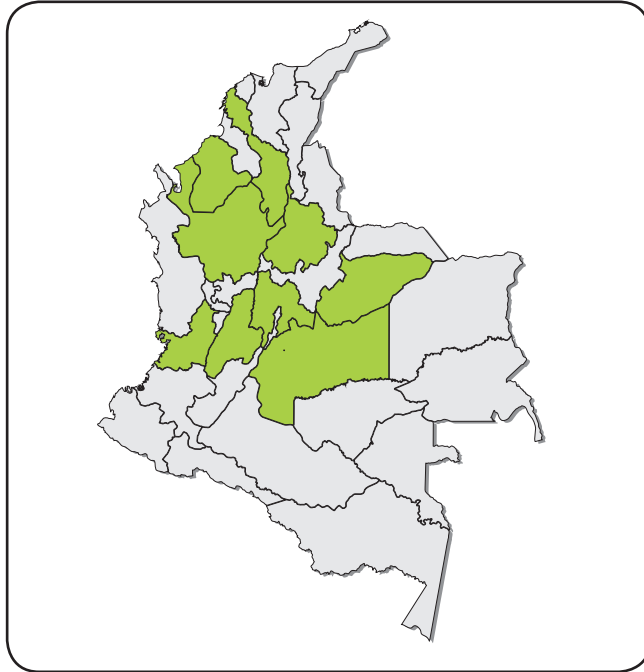


Figura 1. Distribución geográfica de reportes de *Ehrlichia* spp. en Colombia.

Fuente: elaboración propia.

En Colombia la presencia de garrapatas vectores como *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma cajennense*, que afectan a los caninos, hacen que las enfermedades que estas puedan transmitir deban ser considerada en las zonas donde esté presente el vector y donde la enfermedad haya sido diagnosticada previamente (16).

Las garrapatas *R. sanguineus* son muy comunes en los climas cálidos de la región sur de Estados Unidos. Se explica que el ingreso de estos vectores a las Américas se da por caninos parasitados con garrapatas provenientes de Europa (27). Sin embargo estudios recientes mencionan la existencia de dos linajes de *R. sanguineus* s.l. denominados como “linaje del sur” (especies de

clima templado) presente en países como Argentina, Uruguay y Chile y por otro lado, el “linaje del norte” (especies tropicales) que incluye garrapatas de Brasil, Paraguay, Colombia, sur de África, Mozambique y dos zonas del norte de Argentina (28).

Tabla 2. *Ehrlichia canis*, vector y distribución geográfica

Ehrlichia	Especie	Zona geográfica	Vector	Referencia
<i>E. canis</i>	Caninos	Distribución mundial: trópico y climas templados.	<i>R. sanguineus</i>	(10)
<i>E. canis</i> Venezuela	Caninos y humanos	Venezuela	<i>R. sanguineus</i> sensu lato	(29)

Fuente: elaboración propia.

Diagnóstico

Para la detección de *Ehrlichia* spp. se han desarrollado varios métodos con diferentes grados de sensibilidad y especificidad. Inicialmente esta bacteria era identificada usando el microscopio de luz buscando en muestras sanguíneas mórulas en el citoplasma celular (30).

El diagnóstico de la enfermedad puede variar con relación a las diferentes fases y manifestaciones clínicas. Generalmente se asocia el diagnóstico en animales cuya anamnesis reporta viajes a zonas con exposición a garrapatas (2).

Microscopía directa

La microscopía directa con tinción de Giemsa o Diff Quick es un método simple y económico que se realiza mediante el examen de la capa leucocitaria proveniente de una muestra de sangre periférica. A la visualización el parásito aparece como racimos púrpura oscuros, pequeños puntos o a modo de mórulas en el citoplasma de los leucocitos. Otro método directo de diagnóstico es el aspirado con aguja fina a partir de nódulos linfáticos y biopsia de nódulos linfáticos (31).

Las mórulas características de *Ehrlichia* se pueden observar en sangre durante dos semanas, en algunos animales puede variar hasta 52 días postinfección; esto hace que la detección microscópica de los parásitos en la sangre sea más útil en la fase aguda que en la crónica (32).

Inmunofluorescencia Indirecta



IFA (Indirect Immunofluorescence Assay, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más empleadas para el diagnóstico de Ehrlichiosis Monocítica Canina y Humana (33,34); sin embargo, se ha reportado la presencia de falsos positivos debido a la reacción cruzada con otros organismos de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* (35,36).

Esta técnica detecta anticuerpos después de siete días post-infección y determina el título de anticuerpos del animal (37). Para la interpretación de resultados es necesario considerar que algunos caninos pueden tardar en presentar seropositividad hasta el día 28 post-infección por lo tanto se recomienda repetir la prueba en 2-3 semanas (38).

Para confirmar infección activa mediante esta técnica es necesario evaluar muestras del paciente en el periodo agudo y convaleciente para evidenciar seroconversión (diferencia de 4 veces en el título de anticuerpos) ya que el nivel de anticuerpos puede continuar por un periodo prolongado variable incluso post tratamiento. Por lo tanto, una serología positiva implica contacto con el agente, mientras que la evidencia de seroconversión confirma una infección actual (39). Asimismo, se ha mencionado que la IFA puede dar falsos positivos por reacción cruzada con otras Ehrlichias (40,9,36).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La detección de *Ehrlichia* spp. mediante pruebas moleculares como PCR, PCR anidada (nPCR) y PCR en tiempo real (qPCR) permite identificar individuos infectados de forma experimental o natural en la fase aguda o crónica de la enfermedad (41,42). Estudios realizados en Estados Unidos por la Universidad de Kansas evaluaron la detección de múltiples especies de *Ehrlichia*, incluida *E. chaffeensis* (43), y demostraron que la PCR es una herramienta útil para



el monitoreo de infecciones transmitidas por garrapatas en caninos y puede ser adaptada para la detección y seguimiento de enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas en humanos, bovinos y equinos. Igualmente, la PCR puede considerarse como uno de los métodos con mayor especificidad y sensibilidad comparado con los otros métodos de diagnóstico (37,43). La PCR ayuda a caracterizar y diferenciar los distintos microorganismos que causan Ehrlichiosis mediante la amplificación y el posterior análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. Esta técnica permite un diagnóstico rápido y con sensibilidad semejante a las técnicas mencionadas anteriormente (37).

Algunos investigadores han ampliado el alcance de sus estudios más allá de los caninos reportando, a partir de la hemolinfa de *R. sanguineus* s.l. de garrapatas hembras colectadas en animales, el análisis filogenético y molecular basado en el gen 16S rRNA, groEL, dsb y gHA concluyendo la presencia de nuevos microorganismos con propiedades antigénicas nuevas relacionadas con la glicoproteína gp36 (44).

ELISA

La prueba ELISA (ensayo inmunoenzimático) se usa para la detección de anticuerpos de *E. canis* y comercialmente se encuentra el SNAP COMBO Kit® (laboratorio IDEXX) el cual es un análisis de ELISA que identifica una región inmunodominante P30 para lo cual utiliza anticuerpos monoclonales 111H7. Esta prueba posee una sensibilidad del 98.8% y una especificidad del 100% (45). También se han desarrollado pruebas serológicas para evidenciar el contacto con el agente, las cuales se encuentran disponibles comercialmente como ELISA inmunoblot y ELISA competitiva (cELISA) (45,46).

A la luz de lo anterior, las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas de forma adecuada en los diferentes estadios de la enfermedad son una valiosa ayuda a la práctica clínica. Siendo así, mediante la visualización de mórulas se permite el diagnóstico inicial de la enfermedad en la primera aproximación al paciente el extendido en sangre y la citología de nódulos linfáticos en la fase aguda de la enfermedad.

Cabe anotar que para el diagnóstico de esta enfermedad es necesario contar tanto con las pruebas serológicas, que identifican la presencia de anticuerpos




Tabla 3. Métodos diagnósticos, ventajas y desventajas, sensibilidad y especificidad de cada método (24,30,37,42,47,48,49).

Método	Detección	Ventajas	Desventajas	Sensibilidad / Especificidad
Microscopía	Detección de la presencia del agente.	Observación de mórulas.	La identificación varía en las diferentes fases de la enfermedad. Requiere personal entrenado y calificado.	70,1% /51%
ELISA	Valoración de la respuesta inmunitaria (exposición).	Automatizada, reactivos estables y bajo nivel de peligro biológico.	Reacciones inespecíficas y reactividad cruzada.	96,2% /97,7%
IFA	Detección de anticuerpos IgG anti- <i>E. canis</i> .	Confirma la exposición al patógeno.	Resultado negativo no descarta la infección. Reactividad cruzada con otras rickettsias. Repetir prueba a las 2-3 semanas.	90 - 100% /80%
PCR	Detección de la presencia del agente. Análisis del gen 16S rRNA.	Caracterizar y diferenciar microorganismos. Detecta la existencia de infección activa.	Costos y centros de procesamiento de muestra.	33,3% / 100%

Fuente: elaboración propia.

de *Ehrlichia* en pacientes con signos clínicos, como con las pruebas de diagnóstico directo que posibilitan la identificación y diferenciación de especies de *Ehrlichia* (16). La interpretación adecuada de los resultados de las pruebas disponibles comercialmente en forma de kits y de técnicas estandarizadas en laboratorios de investigación permitirá conocer el estado real de la enfermedad en la población canina nacional.

A continuación se presenta la tabla 4 con aspectos clínicos, hallazgos hematológicos y pruebas diagnósticas más efectivas de las diferentes fases de Ehrlichiosis monocítica canina, según la fase (2,42,50).

Tabla 4. Fases de la enfermedad, signos clínicos y paraclínicos.

Fase	Aparición de signos clínicos	Signos clínicos	Hallazgos hematológicos	Pruebas diagnósticas
Aguda	1 a 4 semanas	Fiebre, anorexia, linfadenomegalia vómito y hemorragias.	Anemia normocítica normocrómica, leucopenia con desviación a la izquierda y trombocitopenia.	Microscopía, citología de nódulos linfáticos / IFA * / PCR
Subclínica	6 a 9 semanas	Mucosas pálidas, debilidad, sangrado y pérdida de peso.	Anemia no regenerativa, leucopenia y trombocitopenia.	IFA, ELISA, PCR
Crónica	Meses o años	Epistaxis y petequias.	Pancitopenia.	PCR/ ELISA

*Debe repetirse la prueba en 2 o 3 semanas.

Fuente: elaboración propia.

En Colombia las técnicas disponibles en los laboratorios de diagnóstico para confirmar la presencia de hemoparásitos en la sangre de animales con signos clínicos de enfermedad, aunque son de uso rutinario no son suficientes para obtener un resultado certero. De esta forma, parámetros como la valoración

clínica incluyendo la anamnesis del contacto previo con garrapatas, las respuestas a tratamientos, las pruebas inmunocromatográficas y la observación de formas compatibles con *Ehrlichia* sp. en extendidos de sangre periférica y los lavados ganglionares teñidos con Giemsa o Wright son considerados relevantes para el diagnóstico presuntivo de la enfermedad. Sin embargo, éstos no permiten el diagnóstico preciso (16). También se destaca el uso de pruebas inmunocromatográficas disponibles en kits comerciales.

Avances y nuevas investigaciones

Aunque en Colombia hay reportes de la detección molecular de *Ehrlichia* spp. las pruebas moleculares no están disponibles comercialmente en el país. Se considera relevante que los laboratorios veterinarios incorporen este tipo de pruebas diagnósticas en su portafolio.



Ampliación isotérmica mediada por bucle

Nuevas investigaciones han generado métodos de diagnóstico de vanguardia como la ampliación isotérmica mediada por bucle o LAMP por sus siglas en Inglés (Loop-mediated isothermal amplification). Esta es una técnica rápida y de bajo costo de amplificación isotérmica que no requiere de termociclador y cuyo resultado puede ser visualizado directamente en los tubos de prueba (51,52). En contraste con la PCR convencional, el ensayo LAMP cuenta con una especificidad mayor y reconoce 6 regiones en el DNA muestreado. Estudios del ensayo LAMP en *E. canis* presentan esta herramienta como un test de ácido nucleico o NAT (por sus siglas en inglés) rápido, sencillo y a bajo costo si se logra instaurar comercialmente (53).

Epidemiología molecular

Con los métodos moleculares para diagnóstico como PCR y los análisis de secuencias de ADN, los cuales son una herramienta diagnóstica en casos individuales, se ha abierto la oportunidad de realizar estudios epidemiológicos en garrapatas y los patógenos que estas transmiten (54,55). La incorporación de la epidemiología a los análisis moleculares podría permitir una mayor





vigilancia epidemiológica de las enfermedad e incluso predecir la dinámica de la enfermedad en poblaciones susceptibles para determinar metodologías de control, intervención o prevención de las mismas.


Perspectivas de investigación

Determinar el potencial zoonótico

Se ha reportado que algunos patógenos transmitidos por picaduras de garrapatas tienen características potencialmente zoonóticas (56). Tradicionalmente *E. canis* ha sido considerado como un patógeno exclusivo de perros domésticos y otros cánidos, sin embargo, en 1996 se reportó en Venezuela la primera infección en humanos con *E. canis* presuntamente con infección crónica asintomática (VHE) (57). Se ha sugerido que *E. canis* puede causar la infección en humanos con presentación sintomática y asintomática (57). De igual manera otros estudios han encontrado *R. sanguineus* s.l. y caninos infectados con VHE en Venezuela, lo cual sugiere una potencial transmisión de *E. canis* VHE de caninos a humanos (58).

Otra especie doméstica que se ha comprobado puede infectarse adicional al canino son los gatos pues en un estudio realizado en 2018 se encontraron 3 gatos infectados con *E. canis* (59). La presentación clínica de la ehrlichiosis canina es la misma descrita en los felinos infectados (38).

Dado lo anterior es importante profundizar en el potencial zoonótico de *E. canis* y su epidemiología considerando las siguientes líneas:

- a. Transmisión de caninos a humanos (hogares con animales positivos a la enfermedad).
 - b. Transmisión de caninos a felinos (hogares con varias mascotas de diferente especie y su interacción).
 - c. Control de vectores en hogares con mascotas positivas a la enfermedad.
 - d. Evaluar la exposición del profesional veterinario o personal de las clínicas en contacto con pacientes con Ehrlichiosis canina.
- 

Diversidad genética *E. canis* y relación filogenética entre cepas de diferentes países y regiones

Debido a la distribución mundial del vector de *E. canis*, se hace necesario determinar por regiones o países las cepas presentes y la relación filogenética entre estas. Esto permitiría identificar características epidemiológicas comunes en diferentes países o regiones así como consolidar un mayor conocimiento e información sobre la enfermedad y su vector.

Reevaluar la distribución geográfica del vector en concordancia con el cambio climático


El trópico colombiano con sus componentes climáticos, vegetación exuberante, altas temperaturas y riqueza de fauna promueve el crecimiento de las poblaciones de garrapatas, acompañado a esto, los sistemas de producción animal y las actividades humanas pueden ayudar a aumentar el riesgo de picaduras por garrapatas incrementando de esta forma la transmisión de patógenos tanto a animales como a humanos (60,61).

En Colombia se han descrito muchos tipo de garrapatas (62), sin embargo, con los diversos cambios climáticos actuales son necesarios nuevos estudios que reorganicen la distribución geográfica de los diferentes vectores y los patógenos que estos pueden transmitir. Esta nueva distribución geográfica permitirá implementar protocolos de prevención y eventualmente generar alertas en zonas donde anteriormente no se contemplaba la presencia de garrapatas.

Conclusiones

La ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial que cuenta con reportes en nuestro país y que afecta a una población considerable de caninos, las técnicas de diagnóstico disponibles actualmente son limitadas y la confirmación de la enfermedad requiere del uso de más de una de estas técnicas y su correlación con la clínica del paciente. Sin embargo, aún hay factores que se desconocen o deben reevaluarse sobre la presencia del





vector, el agente infeccioso y la epidemiología de la enfermedad dejando las puertas abiertas a nuevas investigaciones.



Referencias

1. Nyindo M., Huxsoll D.L., Ristic M., Kakoma I., Brown J.L., Carson C.A., Stephenson E.H. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. Am J Vet Res. 1980 Feb;41(2):250-254.
2. Waner T., Harrus S., Bark H., Bogin E., Avidar Y., Keysary A. 1997.Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. Vet Parasitol. 69:307-317.
3. Cardoso L., Mendão C., Madeira de Carvalho L. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. Parasit Vectors. 2012, 5: 62-10.1186/1756-3305-5-62.
4. Dantas-Torres F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. Int J Parasites Wildl. 2015;4:452-61.
5. Cardozo G.P., Santos E.V., Fachin A.L., França S.C., Marins M. A glass bead protocol for recovery of host cell free *Ehrlichia canis* and quantification by Sybr-green real-time PCR. Biocell,2011, 35(1), 35-6.
6. Tamí C.D., Tamí I. Identificación morfológica de *Ehrlichiasp.* en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana en Venezuela. Rev Panam Salud Publica 2004; 16: 345-9.
7. Patrick R., Murray K., Rosenthal M.A. Microbiología Médica. (Ed.) Elsevier. 2007, 5:457.
8. Vieira R.F.C., Biondo A.W., Guimarães A.M.S., Santos A.P., Santos R.P., Dutra L.H., et al. Ehrlichiosis in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2011; 20(1): 1-12. PMid:21439224. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000100002>
9. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(Pt 6): 2145- 2165. PMid:11760958. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
10. Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. Parasit Vectors 2008; 1: 25. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>

11. Muñoz L.E., Casanueva M. Ampliación de ámbito de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Chile. *Revista de Biología Tropical*, 2001,49, 1285-1285.
12. Guglielmone A., Robbins R., Apanaskevich D., Petney T.N., Estrada-Peña A., Horak I. Individual Species Accounts. En Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., & Horak, I., editores. *The Hard Ticks of the World* (Acari: Ixodida: Ixodidae). (Ed.) Springer, 2014 :379.
13. Nava S., Beati L., Venzal J.M., Labruna M.B., Szabó P.J., Petney T., Saracho-Bottero M., Tarragona E., Dantas-Torres F., Silva M., Mangold A.J., Guglielmone A., Estrada-Peña A. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization Ticks and tick-borne diseases, ISSN: 1877-9603, 2018 Vol: 9, Issue: 6, Page: 1573-1585.
14. Cocco R., Sanna G., Cillara M.G., Tola S., Ximenes L., Pinnarparpaglia M.L., Masala G. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;990:126-130. Recuperado de: doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07350.x
15. Pérez M., Bodor M., Zhang C., Xiong Q., Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Oct; 1078:110-7.
16. Benavides J., Ramírez G. Ehrlichiosis canina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2003,16 (3), 268-274
17. Jaramillo G.P. Reporte de un caso clínico de Ehrlichiosis Canina en la Ciudad de Montería, departamento de Córdoba, Colombia. En: *Memorias Primer Congreso Nacional y IV Panamericano de Clínica y Cirugía de pequeñas especies*. VEPA. San Andrés, Colombia. 1996.
18. Silva-Molano R.F., Sánchez-Ucrós N., Loaiza-Echeverri A.M. Reporte de presentación de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. *Revista Veterinaria y zootecnia* 2008; 2:39-43.
19. Hidalgo M., Vesga J.F., Lizarazo D., Valbuena G. Short report: A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chaffeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Jun; 80(6):1029-30.
20. Piedrahita D. Caracterización de ectoparásitos y hemoparásitos en una población de caninos de áreas rurales del Piedemonte Casanareño. Programa de Medicina Veterinaria. Universidad de La Salle. 2012, Tesis (Pregrado).
21. Labarthe N., Rodríguez N., Couto G., Mendes-De-Almeida F., Guerrero J. A pilot survey of vector-transmitted diseases in Cartagena and Barranquilla, Colombia. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2018, 16. 63-73.

- 
- 
22. Salazar H., Buriticá E.F., Echeverry D.F., Barbosa I.X. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). *Rev Colomb Cienc Anim* 2014; 7(1):56-63.
23. McCown M.E., Alleman A., Sayler K.A., Chandrashekar R., Thatcher B., Tyrrell P., et al. Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. *J Spec Oper Med* 2014; 14(4):81-5.
24. Carrillo L., Betancur S., Roldán D., Pérez J., Galeano D., Loaiza E., Giraldo C. Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2012,7 (2), 38-46.
25. Vargas-Hernández G., André M.R., Faria J.L.M., Munhoz T.D., Hernandez-Rodriguez M., Machado R.Z., et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet Parasitol* 2012; 186(3-4):254-60. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
26. López A., Ruíz A. Evaluación de la presencia de *Ehrlichia canis* en caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria en la ciudad de Ibagué mediante la técnica PCR. 2016. Trabajo de grado Universidad de la Salle, Maestría en Ciencias Veterinarias. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10185/18839>
27. Beall M.J., Alleman A.R., Breitschwerdt E.B., Cohn L.A., Couto C.G., Dryden M.W., Yabsley M. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasites & Vectors*, 2012, 5(1), 29. Recuperado de: [doi:10.1186/1756-3305-5-29](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-29)
28. Dantas-Torres F., Latrofa M.S., Annoscia G., Giannelli A., Parisi A., Otranto D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors* 2013 6:213.
29. Harrus S., Waner P., Neer T. Ehrlichia and Anaplasma Infections in Greene. En: *Infectious diseases of the dog and cat*. Fourth edition. 2012, 228.
30. Hildebrandt P.K., Conroy J.D., McKee A.E., Nyindo M.B., Huxsoll D.L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect Immun*. 1973 Feb;7(2):265-271.
31. Birchard S., Sherding R. Enfermedades por Rickettsias. En: *Manual clínico de Pequeñas especies*. Mc.Graw Hill(Ed). 1994, 146:150.
32. Shaw S.E., Day M.J., Birtles R.J., Breitschwerdt E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*. 2001, 17(2), 74-80. Recuperado de: [doi:10.1016/S1471-4922\(00\)01856-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01856-0)

33. Waner T., Harrus S., Jongejan F., Bark H., Keysary A., et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol.* 2001 Feb; 95(1):1-15.
34. Dumler J.S., Madigan J.E., Pusterla N., Bakken J.S. Ehrlichioses in Humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clinical Infectious Diseases.* 2007, 45(Supplement 1), S45-S51. Recuperado de: doi:10.1086/518146
35. Waner T., Harrus S., Bark H., Bogin E., Avidar Y., Keysary A. 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol* 69:307-317.
36. Ristiic M., Huxsoll D.L., Tachibana N., Rapmund G. Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1981, 30:6, 1324-1328.
37. McBride J.W. Identification and Functional Analysis of an Immunoreactive DsbA-Like Thio-Disulfide Oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. *Infection and Immunity*, 2002, 70:5, 2700-2703. Recuperado de: doi:10.1128/iai.70.5.2700-2703.2002
38. Iqbal Z., Chaichana S., Rikihisa Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32, 1658-1662.
39. Neer T.M., Breitschwerdt E.B., Greene R.T., Lappin M.R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med* 2002 May-Jun; 16(3):309-15.
40. Çetinkaya H., Matur E., Akyazi İ., Ekiz E.E., Aydin L., Toparlak M. Serological and molecular investigation of *Ehrlichias* pp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks Tick Borne Diseases.* 2016, 2.
41. Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Hancock S.I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Feb; 42(2):362-8.
42. Macieira D. de B., Messick J.B., Cerqueira A. de M.F., Freire I.M.A., Linhares G.F., Almeida N.K.O., Almosny N.R.P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology.* 2005, 34(1), 44-48. Recuperado de: doi:10.1111/j.1939-165x.2005.tb00008.x
43. Labruna M.B., McBride J.W., Camargo L.M.A., Aguiar D.M., Yabsley M.J., Davidson W.R., Walker D.H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2007, 143(2), 189-195. Recuperado de: doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.005
44. Sirigireddy K.R., Mock D.C., Ganta R.R. Multiplex Detection of Ehrlichia and *Anaplasma* Pathogens in Vertebrate and Tick Hosts by Real-Time RT-PCR. *Annals of the New*

- 
- York Academy of Sciences. 2006,1078: 1, 552-556. Recuperado de: doi:10.1196/annals.1374.108
45. Zweygarth E., Cabezas-Cruz A., Josemans A.I., Oosthuizen M.C., Matjila P.T., Lis K., Passos L.M.F. In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. *Ticks and Tick-Borne Diseases*.2014,5(4), 423-431. Recuperado de: doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.011
 46. 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2000,12(3), 240-244. Recuperado de: doi:10.1177/104063870001200307
 47. Zhang X., Luo T., Keysary A., Baneth G., Miyashiro S., Strenger C., McBride J.W. Genetic and Antigenic Diversities of Major Immunoreactive Proteins in Globally Distributed *Ehrlichia canis* Strains. *Clinical and Vaccine Immunology*.2008, 15(7), 1080-1088. Recuperado de: doi:10.1128/cvi.00482-07
 48. Harith A., Slappendel R., Reiter I., Van Knapen F., De Korte P., Huigen E., Kolk A. Application of a direct agglutination test for the detection of specific anti- *Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology*,1989, 27, 2252-2257
 49. Dawson J.E., Stallknecht D.E., Howerth E.W., Warner C., Biggie K., et al. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994 Nov; 32(11):2725-8.
 50. Romero L., Dolz G., Romero J., Meneses A., Jiménez M., Salazar L. Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. *Revista Ciencias Veterinarias*. 2013, 28(1), 23-36.
 51. Borin S., Crivelenti L.Z., Ferreira F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.2009,61(3), 566-571. Recuperado de: doi:10.1590/s0102-09352009000300007
 52. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2009, 15, 62-69.
 53. Notomi T., Okayama H., Masubuchi T., Yonekawa K., Watanabe N., Amino T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000, 28, E63.
 54. Aparecida F., Salvador A., Lima J., Buso B., Brum M., Silva M., Vieira E., Fachin A., França S., Marins M. Loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Ehrlichia canis* DNA in blood samples from dogs. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2013,45. 197-201. 10.4067/S0301-732X2013000200012.
- 

55. Otranto D., Dantas-Torres F., Breitschwerdt E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol* 2009; 25(5):228-35. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.005>
56. Baneth G. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *International Journal for Parasitology*. 2014, 44:591-6.
57. Attipa C., Pappasoulitis K., Solano-Gallego L., Baneth G., Nachum-Biala Y., Sarvani E. Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vector-borne, pathogens in cats from Cyprus. *Parasites & Vectors*. 2017, 10:130.
58. Pérez M., Rikihisa Y., Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996, 34:2133-2139.
59. Unver A., Pérez M., Orellana N., Huang H., Rikihisa Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39: 2788-2793.
60. Oliveira A.C., Luz M.F., Granada S., Vilhena H., Nachum-Biala Y., Lopes A.P., Baneth G. Molecular detection of *Anaplasma bovis*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon felis* in cats from Luanda, Angola. *Parasites & Vectors*. 2018, 11, 167. Recuperado de: <http://doi.org/10.1186/s13071-018-2767-y>
61. Maegli A., Loy J.D., Cortinas R. Note on *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, and “*Borrelia lonestari*” infection in lone star ticks (*Acari: Ixodidae*), Nebraska, USA. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015, 7 (1): 154-158, 2016. Recuperado de: doi: 10.1016/j.ttbdis..10.008
62. Oteo J.A., Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. En: *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2012, 3 (5-6): 271-278. Recuperado de: DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.035
63. Osorno-Mesa E. Ticks of the Republic of Colombia. 1940. *Biomédica*. 2006, 26 (3): 317-336.