

1-1-2016

Evaluación de la presencia de ehrlichia canis en caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria en la ciudad de Ibagué mediante la técnica PCR

Adriana Patricia López Romero
Universidad de La Salle, Bogotá

Alejandro Ruíz Garzón
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias

Citación recomendada

López Romero, A. P., & Ruíz Garzón, A. (2016). Evaluación de la presencia de ehrlichia canis en caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria en la ciudad de Ibagué mediante la técnica PCR. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/53

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Ehrlichia canis* EN CANINOS SOSPECHOSOS
DE ENFERMEDAD HEMOPARASITARIA EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ MEDIANTE
LA TÉCNICA DE PCR

Tesis de Maestría

ADRIANA PATRICIA LÓPEZ ROMERO

Código 76092206

ALEJANDRO RUÍZ GARZÓN

Código 76092209

Trabajo de grado como requisito para optar el título de
Magister en Ciencias Veterinarias

Bogotá, Colombia

2016

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Ehrlichia canis* EN CANINOS SOSPECHOSOS
DE ENFERMEDAD HEMOPARASITARIA EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ MEDIANTE
LA TÉCNICA DE PCR

Tesis de Maestría

ADRIANA PATRICIA LÓPEZ ROMERO

Código 76092206

ALEJANDRO RUIZ GARZÓN

Código 76092209

Directora:

Arlen Patricia Gómez Ramírez, M.V., Ph.D.

Bogotá, Colombia

2016

Aprobación

DIRECTORA

Arlen Patricia Gómez Ramírez

JURADO

Luis Carlos Villamil Jiménez

JURADO

Leonel Alexander Cardona Rodríguez

JURADO

Efraín Benavides Ortiz

Directivas de la Universidad de La Salle

| | |
|---|------------------------------------|
| RECTOR | Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo |
| VICERRECTOR ACADÉMICO | Hno. Carlos Carvajal Costa |
| VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA | Luis Fernando Ramírez Hernández |
| VICERRECTOR DE PROMOCIÓN Y DESARROLLO HUMANO | Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero |
| VICERRECTOR ADMINISTRATIVO | Dr. Eduardo Ángel Reyes |
| DECANA | Dra. Claudia Aixa Mutis |
| SECRETARIO ACADÉMICO | Dr. Alejandro Tobón |
| DIRECTOR DE POSGRADOS | Dr. Ernesto Dalmau Barrios |

Compromiso

El presente trabajo de grado no contiene ideas contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral. La Universidad, la directora y los jurados no son responsables de las ideas expuestas por los graduandos.

Agradecimientos

Adriana Patricia López Romero

Agradezco a todas las personas que han apoyado el desarrollo de mi maestría en especial a mi madre quien siempre me ha incentivado a estudiar más, a mi padre, a mi abuela, a Daniel, a el Dr. Juan Fernando Vela, Eugenio Cardona, Luis Carlos Villamil y Álvaro Suárez por compartir las angustias y preocupaciones propias del desarrollo de este proyecto y demás familiares y amigos que han estado presentes en este proceso.

A la Dra. Arlen Gómez quien se preocupó desde los primeros semestres por el trabajo de grado y ha apoyado todos los pasos del desarrollo del mismo, al Dr. Javier Jaimes que ha sido parte importante en esta tesis.

A los jurados Dr. Luis Carlos Villamil, Efraín Benavides y Dr. Leonel Cardona, quienes con sus amplios conocimientos han aportado a la construcción científica de esta investigación.

Alejandro Ruíz Garzón

Agradezco en primer lugar a Dios por ser mi guía y orientador principal en la búsqueda de mis metas.

A mis padres y a mi hijo Juan Pablo por su preocupación y acompañamiento constante en este momento de mi vida y de mi formación profesional que implicó tiempo y sacrificio para mi familia.

A la Dra. Arlen Gómez por su constante preocupación, acompañamiento y acertada orientación en el desarrollo de este proceso, de igual forma al Dr. Javier Jaimes por su participación y acompañamiento. A los jurados Luis Carlos Villamil, Efraín Benavides y Leonel Cardona quienes con su gran experiencia y sapiencia en las Ciencias Veterinarias fortalecieron el proceso con su acertada y valiosa evaluación.

Resumen

Las bacterias del género *Ehrlichia* son organismos gram negativos, pleomórficas e intracelulares obligadas que infectan una amplia variedad de mamíferos; particularmente *Ehrlichia canis* se ha identificado como el agente causal de Ehrlichiosis Monocítica Canina. En el país, el diagnóstico de esta enfermedad se basa en la valoración clínica, las respuestas a tratamientos las pruebas inmunocromatográficas y la observación de formas compatibles con el hemoparásito, lo cual no asegura el diagnóstico certero; por lo que es importante fortalecer las alternativas de diagnóstico directo y más aun cuando no existe total claridad en la tipificación de estos agentes. El objetivo de la investigación fue evaluar la posible presencia de *E. canis* mediante una prueba PCR en muestras sanguíneas de caninos residentes en Ibagué (Tolima) con signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina. Para ello se estandarizó la prueba de PCR touchdown para la identificación del gen 16S rRNA y se aplicó a 50 muestras de sangre de caninos (40 con signos clínicos de enfermedad hemoparasitaria y 10 sin signos). Esta investigación corresponde a un estudio no experimental de diseño transversal. En los análisis hematológicos se observó que el 6% de los caninos (4/50) tuvieron un cuadro hemático normal, el resto presentaron alteraciones en sus líneas celulares; además se encontró que el 7.5% de los caninos con signos clínicos (3/40) tenían valores sanguíneos normales y el 10% de los caninos sin signos (1/10) presentaron alteraciones en los parámetros hematológicos. En los frotis sanguíneos no se observaron mórulas características de *Ehrlichia* spp. en ninguno de los extendidos evaluados. Después de los análisis moleculares se

determinó que el 60% de los caninos fueron positivos a *E. canis* por PCR. Los resultados de este estudio se constituyen en un aporte a las detecciones moleculares de *E. canis* realizadas en el país, lo cual puede ser tomado como base para investigaciones futuras que generen el fortalecimiento del diagnóstico y la caracterización de enfermedades con impacto epidemiológico en salud humana y veterinaria.

Palabras clave: Caninos, Diagnóstico, *Ehrlichia*, PCR

Abstract

Ehrlichia are gramnegative, pleomorphic and obligate intracellular bacteria that infect many variety of mammals, particularly *Ehrlichia canis* has been identified as causal agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In Colombia, the disease diagnostic is based in treatment response, immunochromatographic techniques and microscopic forms findings compatible with hemoparasites; this tools do not guarantee a precise diagnostic even so when there is no a certain clarity about agent typification. The aim of this research was evaluate using PCR test the potentiality presence of *E. canis* in blood samples of dogs that resides in Ibague (Tolima) with signs compatible with CME. For this purpose PCR touchdown was standardized to identify 16SrRNA gene, this procedure was applied in 50 canine blood samples (40 animals with clinic signs compatible with *E. canis* and 10 without it). This research is a non-experimental cross design. Hematologic findings reveal that the 6% (4/50) has a normal results, the remaining animals has some change in blood cells, furthermore the study reveal that 7.5% of dogs with clinical signs (3/40) has normal blood values and 10% of control animal group does not have changes in blood parameters (1/10). There is no findings of *E. canis* morula in blood films. Afterward the molecular analysis established that 60% of dogs was PCR *E. canis* positive. This research is one of the first *E. canis* molecular detections in Colombia, which can be the base for future researches that strengthening the diagnostics and

characterization of diseases with epidemiologic impact in human and animal health.

Keywords: Canine, Diagnostic, *Ehrlichia*, PCR

Tabla de Contenido

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 1 |
| Objetivos..... | 6 |
| Objetivo general..... | 6 |
| Objetivos específicos..... | 6 |
| Marco Teórico..... | 7 |
| Etiología..... | 10 |
| Distribución geográfica..... | 13 |
| Signos clínicos..... | 16 |
| Patogénesis y Respuesta inmune..... | 19 |
| Diagnóstico..... | 21 |
| Materiales y Métodos..... | 27 |
| Estructura y Diseño..... | 27 |
| Metodología para la realización del frotis sanguíneo..... | 28 |
| Análisis bioinformáticos..... | 29 |
| Extracción de DNA a partir de sangre completa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 29 |
| Resultados..... | 31 |
| Discusión..... | 40 |
| Lista de referencias..... | 45 |

Lista de tablas

| | | |
|---------|---|----|
| Tabla 1 | Taxonomía de la Familia <i>Anaplasmataceae</i> | 8 |
| Tabla 2 | Tipos de <i>Ehrlichia</i> , vector y su distribución geográfica..... | 14 |
| Tabla 3 | Hallazgos clínicos y hematológicos en las diferentes fases de la enfermedad..... | 18 |
| Tabla 4 | Secuencias de primers utilizados para la detección del gen 16S rRNA de <i>Ehrlichia</i> spp..... | 23 |
| Tabla 5 | Secuencias de nucleótidos y tamaños de los productos de los primers específicos empleados para la detección de <i>E. canis</i> | 30 |
| Tabla 6 | Resultados del cuadro hemático de caninos residentes en Ibagué (Tolima), con signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina..... | 33 |
| Tabla 7 | Secuencias completas reportadas del gen 16S rRNA para <i>Ehrlichia canis</i> | 35 |
| Tabla 8 | Alineación de primers mediante BLASTn con las secuencias de <i>Ehrlichia canis</i> reportadas en Gene Bank..... | 36 |
| Tabla 9 | Principales hallazgos hematológicos en los caninos que presentaron signos clínicos de enfermedad frente a los resultados de la prueba de PCR para <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Ehrlichia</i> género..... | 39 |

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 10 | Grado de trombocitopenia presentada por los pacientes positivos mediante la prueba de PCR a <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Ehrlichia género</i> | 40 |
|----------|---|----|

Lista de figuras

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Representación circular del genoma de <i>E. canis</i> | 12 |
| Figura 2 | Distribución en porcentaje de los signos clínicos utilizados como criterios de inclusión en los caninos de estudio..... | 32 |
| Figura 3 | Imagen representativa de los genes 16S rRNA de <i>Ehrlichia canis</i> (400 pb) y <i>Ehrlichia genero</i> (345 pb)..... | 37 |
| Figura 4 | Distribución de los signos clínicos presentados en los caninos positivos por PCR a <i>Ehrlichia canis</i> | 38 |

Introducción

Las bacterias del género *Ehrlichia* son agentes intracelulares obligados, gram-negativo y pleomórficos que infectan una amplia variedad de mamíferos. Estas bacterias fueron descritas por primera vez en caninos por Donatien y Letosquard en 1935 en Argelia (norte de África); 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 (Huxsoll et al., 1970 citado por Vieira, Biondo, Guimarãs, Santos, Dutra, & Viodotto, 2011). En Colombia, son pocos los reportes de la enfermedad en caninos; uno de los casos clínicos descritos de mayor antigüedad data de 1996 en la ciudad de Montería, departamento de Córdoba (Jaramillo, 1996).

Ehrlichia es una bacteria que se transmite principalmente a través de la picadura de una garrapata infectada, lo cual explica la alta prevalencia de la enfermedad en regiones tropicales y subtropicales relacionada con la distribución geográfica del vector (Passos & Andereg, 1999). Lo anterior, ha caracterizado a este grupo de enfermedades como un problema emergente en el mundo, debido a la alta morbilidad y en algunos casos, a su relevancia zoonótica dado que los perros pueden actuar como transmisores para la enfermedad en humanos (Cardoso, Mendão, & Carvalho, 2012). Por lo tanto la presencia del vector y del huésped determinan en gran medida la probabilidad de encontrar la enfermedad y poder caracterizar el género (Vieira et al., 2011). En Colombia, la presencia de garrapatas vectores

como *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma cajenense*, las cuales afectan a los caninos, hacen que esta enfermedad deba ser considerada (Benavides & Ramírez, 2003).

La Ehrlichiosis Monocítica Canina hace parte de las enfermedades transmitidas por garrapatas o TBD (Tick borne diseases, por sus siglas en inglés), la cual posterior a la fase de infección de los caninos con el agente y con 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 de meses hasta años. La presentación de los signos clínicos varía en cada etapa; sin embargo, las principales manifestaciones son fiebre, anorexia, hepato y esplenomegalia, también se reportan alteraciones como uveítis y poliartritis. En la fase crónica se ha descrito deterioro en la producción medular de células sanguíneas lo cual se puede manifestar con pancitopenias e incluso con daños en la médula ósea (Rikihis, Ewing, Fox, Gani, Pasaribu, & Malole, 2003).

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 (Hildebrandt, Conroy, McKee, Nyindo, & Huxsoll, 1973). 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 (Shaw, Day, Birtles, & Breitschwerdt, 2001).

La 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 (Waner, Harrus, Jongejan, Bark, Keysary, & Cornelissen, 2001; Dumler, Madigan, Pusterla, & Bakken, 2007); 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* (Ristic, Huxsoll, Tachibana, & Rapmund, 1981; McBride, 2002). 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) (Waner, Strenger, & Keysary, 2000; Zhang, Luo, Keysary, Baneth, Miyashiro, Strenger, & McBride, 2008).

La detección de *Ehrlichia* spp. mediante pruebas moleculares como PCR, PCR anidada (nPCR) y PCR en tiempo real (qPCR) ha sido usada para identificar individuos infectados de forma experimental o natural en la fase aguda o crónica de la enfermedad (Macieira, Messick, Cerqueira, Freire, Linhares, Almeida, & Almosny, 2005; Labruna, McBride, Camargo, Aguiar, Yabsley, Davidson, & Walker, 2007). En Estados Unidos se han realizado varios estudios mediante técnicas moleculares, como el realizado en la Universidad de Kansas donde se evaluó la detección de múltiples especies de *Ehrlichia*, incluida *E. chaffensis* (Sirigireddy, Mock, & Ganta, 2006), demostrando así que la técnica de 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 otros (Iqbal, Chaichana, & Rikihisa, 1994; Labruna et al., 2007).

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, pruebas inmunocromatográficas y la observación de formas compatibles con *Ehrlichia* sp. en extendidos de sangre periférica y lavados ganglionares teñidos con Giemsa o Wright son considerados para el diagnóstico presuntivo de la enfermedad; sin embargo, éstos no permiten el diagnóstico preciso (Benavides & Ramirez, 2003).

En ciudades de clima cálido como Ibagué, ubicada sobre la cordillera Central en los Andes colombianos, el problema relacionado con la presencia de garrapatas es marcado y por ende la cantidad de animales enfermos por hemoparásitos puede ser alta; sin embargo, se desconoce la prevalencia y el impacto de dichos agentes. Aunque en Colombia hay dos reportes de la detección molecular de *Ehrlichia* spp. (Vargas et al., 2012; Carrillo et al., 2012), las pruebas moleculares no están disponibles comercialmente en el país por lo que se destaca la importancia de realizar estudios en la estandarización y aplicación de estas metodologías

debido a su pertinencia, relevancia e impacto científico como un aporte a la epidemiología y a la salud pública.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la posible presencia de *E. canis* mediante la técnica de PCR en muestras sanguíneas de caninos residentes en Ibagué (Tolima) con signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina.

Objetivos específicos

- Identificar y seleccionar caninos con signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina de los que se obtendrán muestras para análisis hematológicos.
- Realizar los análisis bioinformáticos de los genes y los *primers* seleccionados para la identificación de *Ehrlichia* género y *E. canis*.
- Estandarizar una técnica de PCR para la identificación del gen 16S del rRNA de *E. canis* y evaluar la presencia de estos microorganismos a partir de ADN extraído de sangre completa de los caninos seleccionados previamente.
- Asociar el cuadro clínico con los análisis moleculares obtenidos de las muestras de caninos del estudio en la ciudad de Ibagué.

Marco teórico

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (TBD por sus siglas en inglés Tick-borne diseases) en caninos han ganado relevancia en la práctica veterinaria debido a que los vectores que las transmiten están distribuidos a nivel mundial. Las diferentes especies de garrapatas son vectores potenciales de organismos patógenos, en el caso de las garrapatas pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae* estas son vectores de espiroquetas, rickettsias, babesias y ehrlichias, entre otros (Tabla 1).

Las garrapatas son portadoras de agentes patógenos que pueden transmitir enfermedades tanto en el humano como a una gran variedad de animales. Actualmente 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. (Muñoz & Casanueva, 2001; Guglielmo, Robbins, Apanaskevich, Petney, Estrada-Peña, & Horak, 2014).

La distribución geográfica de algunas especies de *Ehrlichia* no se ha establecido completamente en el mundo; sin embargo, la presencia de *E. canis* ha sido descrita en la mayoría de las regiones (Cocco, Sanna, Cillara, Tola, Ximenes, Pinnarparaglia, & Masaka, 2003; Perez, Bodor, Zhang, Xiong, & Rikihisa, 2006). En Colombia se ha reportado

Ehrlichiosis Canina mediante detección del agente o la evidencia de contacto 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 (Jaramillo, 1996) , Cali (Valle del Cauca) con un reporte de seropositividad contra *E. canis* del 49.5% de 101 perros evaluados mediante la técnica de ELISA (Silva-Molano, Sánchez-Ucrós, & Loaiza-Echeverri, 2008), Villeta (Cundinamarca) donde se encontró una seropositividad contra *Ehrlichia* spp. de 31.8% de los caninos evaluados (Hidalgo, Vesga, Lizarazo, & Valbuena, 2009), Medellín con frecuencias de positividad a *Ehrlichia* sp. de 11.2% en pacientes sintomáticos a través de herramientas moleculares (Carrillo, Betancur, Roldan, Perez, Galeano, Loaiza, & Giraldo, 2012), piedemonte casanareño donde se detectó la presencia de *E. canis* en un canino de 31 evaluados (Piedrahita, 2012), Ibagué con una seroprevalencia del 31.6% (Salazar, Buriticá, Echeverry, & Barbosa, 2014), Villavicencio, Bogotá y Bucaramanga con el 40.6% de positividad por PCR de 91 caninos sintomáticos muestreados (Vargas-Hernandez, André, Faria, Munhoz, Hernandez- Rodriguez, Machado, & Tinucci-Costa, 2012).

La Ehrlichiosis Monocítica Canina es una enfermedad multisistémica causada por una rickettsia (*E. canis*) que se manifiesta de forma subclínica o crónica. Puede afectar caninos de todas las razas pero con mayor susceptibilidad al Pastor Alemán, que presenta una forma más severa de la enfermedad con una alta morbilidad y mortalidad comparada con otras razas

(Nyindo, Huxsoll, Ristic, Kakoma, Brown, & Carson, 1980) Este agente no presenta predilección de edad o género (Waner & Harrus, 1997).

Tabla 1a

Taxonomía de la Familia Anaplasmataceae.

| Especie | Nombre común de la enfermedad | Hospederos naturales | Células más comúnmente infectadas | Vectores primarios | Distribución |
|---|--|--|--|---|--|
| <i>Ehrlichia chaffeensis</i> | Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME). | Humanos, perros y ciervos. | Células mononucleares | <i>Amblyomma americanum</i> | USA, Europa, África, Sur y Centro América. |
| <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (anteriormente llamado: Agente HGE, <i>E. equi</i> , <i>E. phagocytophilum</i>) | Ehrlichiosis Granulocítica Humana (HGE), Ehrlichiosis Equina, Fiebre transmitida por garrapata y Fiebre de pasturas. | Humanos, ciervos, roedores silvestres, alce, caballos, llamas, ovejas, bovinos, bisones. | Granulocitos | <i>Ixodes scapularis</i> e <i>I. pacificus</i> en USA; <i>I. ricinus</i> en Europa. | USA, Gran Bretaña, Europa. |
| <i>Neorickettsia risticii</i> (anteriormente llamado: <i>E. risticii</i>) | Fiebre Equina de Potomac y Ehrlichiosis Monocítica Equina. | Caballos | Células mononucleares | Tremátodos en caracoles e insectos acuáticos. | USA |
| <i>Ehrlichia canis</i> | Ehrlichiosis Monocítica Canina | Perros, lobos y chacales. | Células mononucleares | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | Distribución mundial |

Modificado de: <http://riki-lb1.vet.ohio-state.edu/background/ehrlichiaspp.php>

Tabla 1b

Taxonomía de la Familia Anaplasmataceae.

| Especie | Nombre común de la enfermedad | Hospederos naturales | Células más comúnmente infectadas | Vectores primarios | Distribución |
|---|---|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>Neorickettsia sennetsu</i> (anteriormente llamado: <i>E. sennetsu</i>) | Fiebre de Sennetsu (rickettsiosis); Fiebre Glandular. | Humanos | Células mononucleares | Tremátodos en peces. | Japón, Malasia. |
| <i>Ehrlichia ewingii</i> | Ehrlichiosis Granulocítica Canina y Humana. | Humanos y perros. | Granulocitos | <i>Amblyomma americanum</i> | USA |
| <i>Ehrlichia muris</i> | Desconocido | Roedores | Células mononucleares | <i>Haemaphysalis</i> spp. | Japón, Malasia |
| <i>Anaplasma platys</i> (anteriormente llamado: " <i>E. platys</i> ") | Trombocitopenia Cíclica Canina | Perros | Plaquetas | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | USA, Japón, Venezuela, Tailandia, Europa, Taiwán, Grecia e Israel. |
| <i>Ehrlichia ruminantium</i> (anteriormente llamado: <i>Cowdria ruminantium</i>) | Cowdriosis | Bovinos, ovejas, cabras | Células endoteliales | <i>Amblyomma</i> | África y Caribe. |

Modificado de: <http://riki-lb1.vet.ohio-state.edu/background/ehrlichiaspp.php>

Tabla 1c

Taxonomía de la Familia Anaplasmataceae.

| Especie | Nombre común de la enfermedad | Hospederos naturales | Células más comúnmente infectadas | Vectores primarios | Distribución |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|--|----------------------------------|---|
| <i>Neorickettsia helminthoeca</i> | Envenenamiento con salmón | Perros | Macrófagos | <i>Nanophyetus salmincola</i> | California del norte, Washington, Oregon e Idaho. |
| "Agente SF" | Desconocido | Desconocido | Desconocido | <i>Stellantochasmus falcatus</i> | Japón |
| <i>Anaplasma marginale</i> | Anaplasmosis Bovina | Rumiantes | Hematíes | Varias especies de garrapatas. | Distribución mundial |
| <i>Wolbachia pipientis</i> | Desconocido | Desconocido | Desconocido | Varios artrópodos, nematodos. | Distribución mundial |

Nota: Modificado de: <http://riki-lb1.vet.ohio-state.edu/background/ehrlichiaspp.php>. Rikihisa. 1996.

Actualmente se conoce como vector para la transmisión de *E. canis* a la garrapata *R. sanguineus*, considerándose como la garrapata de mayor distribución mundial, la cual se cree que es originaria del 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, algunos reptiles, aves y a los humanos, pero principalmente afecta a los caninos (Dantas-Torres, 2008).

En Colombia la presencia de garrapatas vectores que parasitan a los perros como *R. sanguineus* deben ser un factor importante para tener en cuenta como responsables de la presentación de la enfermedad por su distribución epidemiológica en nuestro medio y la importancia en la práctica clínica en caninos a nivel nacional (Benavides & Ramírez, 2003).

Etiología

El agente etiológico de la Ehrlichiosis es una bacteria intracelular obligatoria, gram-negativa, de forma cocoide, que requiere de un mamífero como reservorio y de un artrópodo como vector. Este microorganismo presenta tropismo por células sanguíneas (leucocitos y plaquetas) de animales y humanos (Cardoso, Santos, Fachin, Franca, & Marins, 2011), en las que invade su citoplasma alojándose dentro de vacuolas, donde se multiplica por fisión binaria, lo anterior da origen a un agregado de la bacteria o microcolonia, que por su apariencia se ha denominado "mórula" (Tamí & Tamí, 2004).

La clasificación taxonómica de este microorganismo ha experimentado variaciones a medida que se profundiza en su estudio. 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 con base en el análisis de las secuencias del gen 16S del rRNA, el operon 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 (Dumler, Barbet, Bekker, Dasch, Palmer, Ray, Rikihisa, & Rurangirwa, 2001), 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) y en el género *Neorickettsia*: *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*, reforzada por características biológicas y antigénicas, se ha presentado una nueva reorganización de los miembros de la familia *Ehrlichieae* (Dumler et al., 2001) 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* (Tamí & Tamí, 2004). Las bacterias son pequeñas (0.2 a 0.5 μm), se tiñen débilmente con la tinción de Gram, 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 (Patrick, Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2007). 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 (Murray et al., 2007). Se han adelantado varios estudios acerca del genoma de *E. canis* los cuales han determinado que el genoma de esta bacteria es más pequeño que el de otras Ehrlichias, pero tienen un número similar de genes. Se han reportado un total de 984 genes en el genoma de la *E. canis* incluyendo los genes rRNA (5S, 16S, y 23S) (Mavromatis, Doyle, Likidis, Ivanova, Francino, Chain, & Kyrpides, 2006). Actualmente se han reportado 759 secuencias parciales del gen 16S rRNA en las bases de datos (National Center for Biotechnology Information, 2013).

El genoma de *E. canis* consta de un cromosoma simple circular que abarca 1.315.030 nucleótidos. El origen de la replicación de la bacteria es alrededor de la región comprendida entre las 630 y 670 kb. El genoma de *E. canis* es más pequeño que el de otras Ehrlichias, pero tienen un número similar de genes. Se han reportado un total de 984 genes en el genoma de *E. canis* incluyendo los genes rRNA (5S, 16S, y 23S). Es de relevancia el reconocimiento de las características genéticas del patógeno para determinar los genes de interés a identificar mediante la prueba de PCR. La distribución del genoma completo se muestra en la figura 1, en la cual se encuentran de afuera hacia dentro los dos primeros círculos representan las secuencias. Los colores indican lo siguiente: gris oscuro: proteínas hipotéticas; gris suave: proteínas conservadas de función desconocida; café: proteínas de funciones generales; rojo: proteínas de replicación y reparación; verde: proteínas de metabolismo energético; azul: proteínas asociadas con el metabolismo del carbono y carbohidratos; cian: metabolismo lipídico; magenta: transcripción; amarillo: proteínas de traducción; naranja: metabolismo de aminoácidos; rosado: metabolismo de cofactores y vitaminas; rojo pálido: metabolismo de purinas y pirimidinas; lavanda: señales de transducción y azul cielo: procesos celulares. El tercero y cuarto círculo representan los genes RNA. El quinto y sexto círculo representan la codificación de secuencias (Mavromatis et al., 2006).

Distribución geográfica

Las enfermedades causadas por rickettsias son muy comunes en perros, pero extremadamente raras en gatos. La Ehrlichiosis Monocítica Canina es una enfermedad infecciosa potencialmente fatal en los caninos. Así mismo, se han descrito como patologías agudas en áreas endémicas, presentando mayor prevalencia en épocas cálidas en países templados. El curso clínico de estas enfermedades puede ser de agudo o subagudo a crónico (Birchard & Sherding, 1994).

La distribución geográfica de la principal garrapata transmisora de la enfermedad (*R. sanguineus*) está dada principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Las mismas especies pueden ser vectores de varias enfermedades hemoparasitarias como *Ehrlichia*, *Babesia* y *Hepatozoon* (Kledmanne, Suwanpakdee, Krajangwong, Chatsiriwech, Suksai, Suwannachat, Sariya, Buddhirongawatr, Charoonrut, & Chaichoun, 2009) como se muestra en la Tabla 2.

Las garrapatas *R. sanguineus* son muy comunes en los climas cálidos de la región sur de Estados Unidos de América, esto se debe en parte a su origen mediterráneo y en general a su intolerancia a temperaturas frías. Se plantea que el ingreso de estos vectores a las Américas se dio mayormente por caninos infestados de garrapatas provenientes de Europa, debido a que estas garrapatas pueden sobrevivir dentro de las instalaciones o construcciones independientemente de la presencia o no de caninos y en el momento de estar presentes estos

parasitar los perros, desarrollando la enfermedad (Beall, Alleman, Breitschwerdt, Cohn, Couto, Dryden, & Yabsey, 2012).

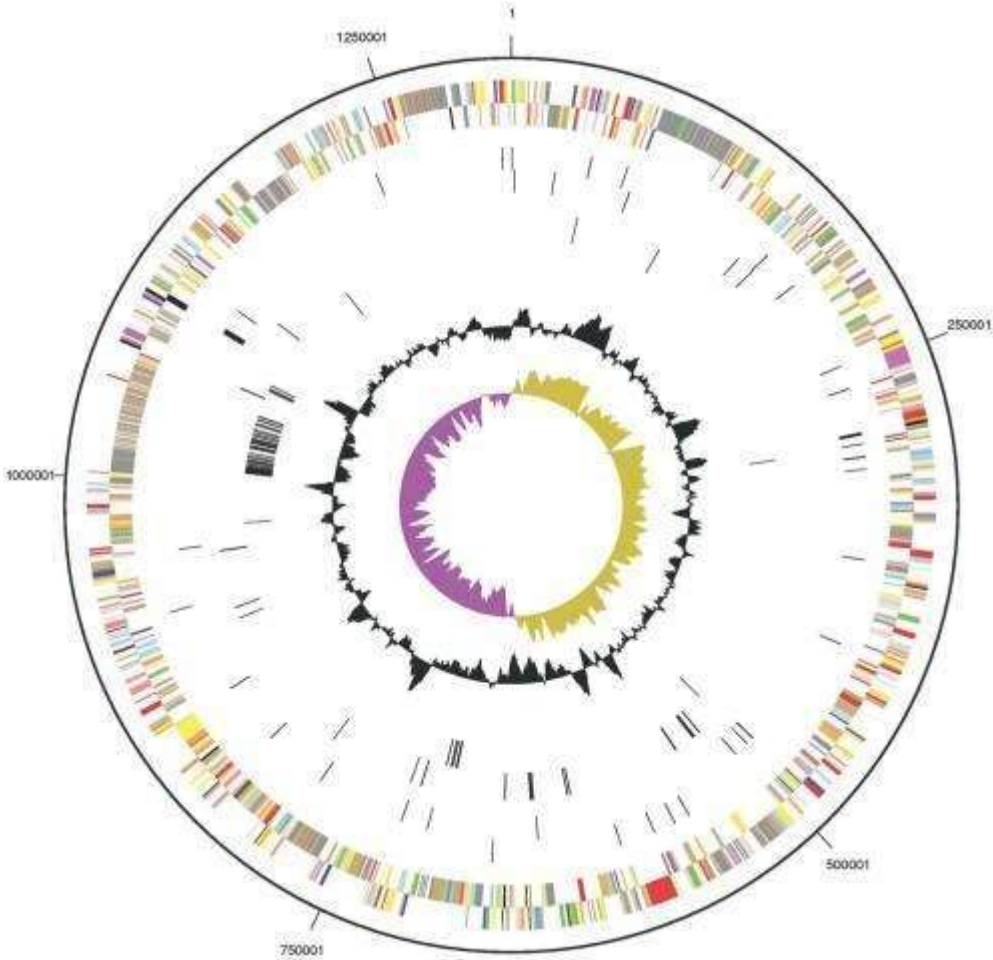


Figura 1. Representación circular del genoma de *E. canis*. Fuente: Mavromatis et al., 2006

Tabla 2

Tipos de Ehrlichia, vector y su distribución geográfica.

| <i>Ehrlichia</i> | Especie | Zona geográfica | Vector | Referencia |
|--------------------------|---------------------------------------|---|---|--|
| <i>E. canis</i> | Caninos | Distribución mundial: trópico y climas templados. | <i>R. sanguineus</i> | Dantas-Torres et al., 2008 |
| <i>E. ruminantium</i> | Bovinos | África, Norteamérica, Sudamérica, Asia y Australia. | <i>A. variegatum</i> | Dumler et al, 2001; Muramatsu, 2005 |
| <i>E. chaffeensis</i> | Ciervos | Estados Unidos | <i>A. americanum</i> , <i>D. variabilis</i> . | Dumler et al, 2001; Yabsley, 2010. |
| <i>E. ewingii</i> | Humanos y perros. | Estados Unidos | <i>A. americanum</i> , <i>D. variabilis</i> . | Dumler et al, 2001; Yabsley, 2010. |
| <i>E. muris</i> | Roedores | Europa y Asia. | <i>Haemaphysalis flava</i> , <i>Ixodes persulcatus</i> . | Tamamotoa et al., 2007. |
| <i>E. platys</i> | Caninos | Estados Unidos, Europa y Sudamérica. | <i>R. sanguineus</i> | Neer et al., 2002. |
| <i>E. equi</i> | Equinos y caninos. | Estados Unidos | <i>Ixodes pacificus</i> | Hancock et al., 2001; Neer et al., 2002. |
| <i>E. risticii</i> | Equinos | Estados Unidos y Canadá. | - | Neer et al., 2002 |
| <i>E. phagocytophila</i> | Ovinos, equinos, caprinos y bovinos . | Estados Unidos, África, Asia y Europa. | <i>Ixodes ricinus</i> | Pusterla & Huder, 1999; Neer et al., 2002. |

Actualmente los aislamientos concordantes con secuencias del gen 16 S rRNA correspondientes a *E. canis* son similares en un 99.4 a 100% en Sudamérica, Norteamérica, Asia, Europa, África y el Este Medio (Aguiar, Zhang, Melo, Pacheco, Meneses, Zanutto, & Labruna, 2013).

En Colombia se ha reportado el organismo en diferentes regiones del país. En Manizales se reportó un caso diagnosticado mediante la detección de anticuerpos (Benavides & Ramírez, 2003); en Montería se comprobó la enfermedad en 20 de 74 perros sospechosos utilizando la técnica de capa sanguínea blanca teñida con Wright; en Cali se encontró una seropositividad del 49,5% en 101 perros sospechosos a *E. canis*, usando la prueba ELISA (Silva, Sánchez, & Loaiza, 2008), otro estudio en la ciudad de Medellín realizado por Gil et al. en 2012 indica que el 1.2% de animales con sintomatología clínica del estudio fueron confirmados como positivos a *Ehrlichia* mediante la técnica de PCR. Entre los estudios realizados a nivel nacional cabe resaltar hallazgos como el encontrado en 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.

Signos clínicos

La Ehrlichiosis Monocítica Canina después del período de incubación de 8-20 días, se puede manifestar de forma aguda, subaguda y crónica (Rikihisa et al., 1992). La forma aguda presenta una duración variable (de una a cuatro semanas), las otras dos fases pueden durar meses o años. Algunos de los signos clínicos presentados comúnmente son: fiebre, anorexia, emaciación, hepato y esplenomegalia, alteraciones cardíacas, oculares y nerviosas (Moreira, Bastos, Araújo, Santos, & Passos, 2003) entre las alteraciones oculares se destacan: uveítis anterior, queratoconjuntivitis, hifema y coriorretinitis. En la etapa final, la Ehrlichiosis Monocítica Canina se manifiesta con hemorragias, linfadenopatías, esplenomegalias, poliartropatías y signos neurológicos (Ettinger & Feldman, 1997). La patología renal se caracteriza por la presentación de glomerulonefritis asociada a inmunocomplejos, dando como signo, una marcada proteinuria.

La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por fiebre alta, depresión, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia y tendencias hemorrágicas. Posteriormente el paciente presenta petequias y equimosis dérmicas, epistaxis y lesiones oftalmológicas como uveítis anterior, coriorretinitis, hemorragia retinal y presencia de infiltrados perivasculares retinales (Komnenou, Mylonakys, Kouti, Tendoma, Leontides, Skountzou, & Ofri, 2007). En algunos casos llega a la ceguez como resultado de hiperviscosidad sanguínea y hemorragia subretinal con su consecuente deterioro retinal, pueden presentarse manifestaciones neurológicas resultado de meningoencefalomielitis.

Durante la fase subclínica, el paciente no presenta signos clínicos evidentes, los hallazgos suelen ser mucosas pálidas, sangrado y pérdida de peso (Waner & Harrus, 1997), los cuales son signos comunes a múltiples enfermedades bacterianas y virales en los caninos. Las diferentes fases de la enfermedad y sus manifestaciones se resumen en la tabla 3.

Experimentalmente la infección con *E. canis* se presenta con estados subclínicos y crónicos de la enfermedad; los animales enfermos presentan signos como fiebre, letargia, descarga oculonasal, cojeras y anormalidades en las pruebas de laboratorio como trombocitopenia, anemia no regenerativa, leucopenia, hiperglobulinemia y proteinuria en los diferentes estados de infección (Gaunt, Beall, Stillman, Lorentzen, Diniz, Chandrashekar, & Breitschwerdt, 2010).

Las anormalidades hematológicas y bioquímicas incluyen trombocitopenia, anemia leve a intensa, leucopenia, hiperglobulinemia y elevaciones de las enzimas hepáticas (Waner & Harrus, 1997).

Tabla 3

Hallazgos clínicos y hematológicos en las diferentes fases de la enfermedad.

| Fase | Aparición de signos clínicos | Signos clínicos | Hallazgos hematológicos | Referencias |
|-------------|-------------------------------------|---|---|---|
| Aguda | 1 a 4 semanas | Fiebre, anorexia, linfadenomegalia, vómito y hemorragias. | Anemia normocítica normocrómica, leucopenia con desviación a la izquierda, trombocitopenia. | Moreira et al., 2003, Labruna et al., 2007, Borin et al., 2009. |
| Subclínica | 6 a 9 semanas | No hay signos evidentes, mucosas pálidas debilidad, Sangrado y pérdida de peso. | Anemia no regenerativa, leucopenia y trombocitopenia. | Waner & Harrus, 1997; Moreira et al., 2003; Borin et al., 2009. |
| Crónica | Meses o años | Epistaxis y petequias. | Pancitopenia | Moreira et al., 2005 |

La trombocitopenia, leucopenia y anemia normocítica normocrómica son comunes en pacientes con *Ehrlichia* (Rikihisa et al., 1992). En 1996, McBride, Corstvet, Gaunt, Chinsangaram, Akita, & Osburn observaron trombocitopenias después del día 28 post-inoculación y presencia de altos títulos de IgG, después del día 14 post-inoculación. Se ha reportado descenso en los niveles de ADP (Adenosín difosfato) y fibrinógeno, moléculas necesarias en los procesos de coagulación (Botros, Elmolla, Salib, Calamaio, Dash, & Arthur, 1995).

Se ha concluido que es difícil determinar el momento de la infección ya que se puede dar sin la presencia de signos asociados a la enfermedad, pero se ha evidenciado que el pico de evolución de la infección es aproximadamente en la tercera a cuarta semana post infección (Hasegawa, 2005).

Patogénesis y respuesta inmune

La infección por *E. canis* resulta de la replicación de la bacteria en el interior de las células mononucleares fagocíticas, en las cuales se da la formación de una mórula o colonia bacteriana la cual se encuentra rodeada y protegida por una membrana vacuolar (Cohn, 2003).

La patogénesis se caracteriza por una fase aguda de duración variable, en la cual el microorganismo se multiplica en las células mononucleares, principalmente en el sistema fagocítico mononuclear de los nódulos linfáticos, el bazo, el hígado y la médula ósea, dando como resultado organomegalia, trombocitopenia, anemia y leucopenia. La fase subclínica a crónica se caracteriza por la persistencia del microorganismo y la exacerbación del efecto

sistémico (Birchard & Sherding, 1994). En algunos pacientes se puede evidenciar uveítis, membranas mucosas pálidas y arritmias en etapas avanzadas (Ettinger & Feldman, 1997).

Se pueden presentar infiltrados mononucleares en vísceras, ojos y médula ósea, evidenciando la presencia de células infectadas en estos sitios, las cuales generan procesos inflamatorios inmunomediados caracterizados por un incremento de la respuesta humoral expresada en hipergammaglobulinemia (McBride et al., 1996); posteriormente se expresa la respuesta celular, en la cual se destaca el compromiso de los linfocitos T citotóxicos. El daño hístico genera la síntesis de integrinas y selectinas del epitelio vascular, seguido por la activación de macrófagos que liberan TNF- α , IL-1 e IL-6. De esta forma, la respuesta inmune ante la *Ehrlichia* inicia con la presencia de células T e INF, determinando así que los linfocitos T desempeñan un papel importante en la respuesta inmune protectora frente al patógeno (Waner et al., 2001).

La respuesta inmune del animal induce vasculitis como consecuencia de todo el proceso de respuesta humoral y celular, desencadenando pérdida de glóbulos rojos que migran por diapedesis en los endotelios afectados. Así mismo se presenta destrucción de glóbulos blancos que contienen el hemoparásito y finalmente consumo de plaquetas por agregación de las mismas en los lugares comprometidos. En consecuencia a todo lo anterior se presentan los cuadros de pancitopenia, que en la fase crónica están acompañados por deterioro en la producción de elementos celulares por parte de la médula ósea (Tizard, 1996).

Existe la creencia general que las bacterias intracelulares tienen la habilidad de replicarse en las células del hospedero y de esta forma evadir el sistema inmune del individuo considerándose un mecanismo de protección (Pérez, Rikihisa, & Wen, 1996). El mecanismo principal de defensa es el celular mediante la destrucción de la bacteria intracelular por parte de los monocitos mediante mecanismos oxidativos (Brouqui & Dumler, 2002); sin embargo en otras bacterias como *E. risticii* y *E. sennetsu*, se ha demostrado la multiplicación del patógeno mediante la habilidad de inhibir la fusión entre los fagosomas y los lisosomas (Park & Rikihisa, 1991). Es por esta vía que actúa el tratamiento con Doxiciclina, ya que este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas procarióticas, restaurando así la fusión e inhibiendo la síntesis de la proteína producida por la bacteria para dicho fin (Wells & Rikihisa, 1988). En estudios *in vitro* se ha logrado inhibir la replicación de la *E. risticii* mediante la generación de óxido nítrico y la limitación de acceso al hierro (Park & Rikihisa, 1991).

El papel de los anticuerpos humorales en infecciones Rickettsiales es casi desconocido ya que las inmunoglobulinas no pueden acceder a las células infectadas lo cual limita su función protectora. Sin embargo algunos estudios han demostrado que tratamientos previos con anticuerpos monoclonales previenen o reducen la infección evitando la penetración en la célula hospedera (Messick & Rikihisa, 1994).

Se ha determinado que la infección con *E. canis* genera anticuerpos específicos; en infecciones experimentales los anticuerpos IgM y IgA aparecen de 4 a 7 días posterior a la

infección en un rango de 1:160 y 1:1640 y los anticuerpos IgG 15 días después (Weisiger, Ristic, & Huxsoll, 1975; Waner & Harrus, 1996).

Diagnóstico

En Colombia se establecen diagnósticos presuntivos de Ehrlichiosis Monocítica Canina basados en la condición clínica del paciente, el antecedente de contacto con garrapatas, ensayos terapéuticos y observación de formas compatibles en extendidos de sangre periférica (Benavides & Ramírez, 2003), también se destaca el uso de pruebas inmucromatograficas disponibles como Kits comerciales.

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 (Waner & Harrus, 1997).

La microscopia directa con tinción de Giemsa o Diff Quick se realiza mediante el examen de la capa leucocitaria proveniente de una muestra de sangre periférica; este método es simple y poco costoso. 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 (Birchard & Sherding, 1994).

La prueba de PCR ayuda a caracterizar y diferenciar los distintos microorganismos que causan Ehrlichiosis; mediante el análisis del gen 16S rRNA (Tabla 4). Esta técnica permite un diagnóstico rápido y con sensibilidad semejante a las técnicas mencionadas anteriormente

(Iqbal et al., 1994). Se han realizado estudios en los cuales mediante PCR en diferentes tejidos encontraron animales positivos a *E. canis* y *A. platys* en sangre y nódulos linfáticos (Gal, Loeb, Yisaschar-Mekuzas, & Baneth, 2008).

Investigaciones a partir de varias especies de garrapatas evaluaron la presencia del parásito mediante técnicas de PCR multiplex. En el estudio de Kledmanee et al. en 2009 a partir de *Amblyomma americanum* se aisló *E. chaffeensis* y *E. ewingii* y se estudió la presencia de *E. canis*, *Babesia* spp. y *Hepatozoon canis* en animales sospechosos en regiones endémicas con *R. sanguineus*. En este estudio se encontró que cinco animales positivos a *E. canis* mediante PCR resultaron también positivos a *Ehrlichia* spp. mediante detección morfológica. La técnica de PCR Múltiple, propuesta por estos autores, permite la identificación de *E. canis*, *Babesia* spp. y *Hepatozoon canis* en una sola reacción, lo cual facilita el tratamiento de los animales sospechosos de estos hemoparásitos, teniendo en cuenta que según el agente causal el tratamiento varía.

El diagnóstico de la Ehrlichiosis Monocítica Canina también puede realizarse mediante métodos indirectos como lo son la prueba de ELISA e Inmunofluorescencia.

La prueba ELISA (ensayo inmunoenzimático) se usa para la detección de anticuerpos de *E. canis*; 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% (Waner et al., 2000).

La Inmunofluorescencia (IFA por sus siglas en inglés Immunofluorescence Assay) es una prueba para la determinación serológica de la presencia de *E. canis*, la cual es altamente sensible. Mediante esta prueba se consideran como diagnósticos títulos mayores de 1:10; sin embargo, debe tenerse en cuenta que este método puede tener una ligera reactividad cruzada con otras rickettsias (Birchard & Sherding, 1996). Estudios realizados en Nicaragua evaluaron la presencia de *E. canis* en una población de perros del municipio de León, encontrando mediante esta técnica 17 pacientes positivos de 27 animales analizados, equivalente al 63% (Lara, Aranciba, Saenz, & Bonilla, 2010).

El estudio realizado por Bélanger et al. en 2002 comparó la detección de *E. canis* mediante diferentes métodos de diagnóstico serológico: Snap3Dx Snap canine combo test kit (Laboratorios IDEXX) el cual usa antígenos purificados para evaluar la presencia de anticuerpos específicos, e InDx canine multitest Dip-S-Ticks assay (PanBio InDx, Inc., Baltimore, Md.) el cual es un test rápido de inmunocromatografía, obteniendo la sensibilidad más alta con la prueba Dip-s-Ticks y la más baja con el Snap combo, además la prueba Snap 3Dx mostró la más alta especificidad.

Tabla 4

Secuencias de primers utilizados para la detección del gen 16S rRNA de Ehrlichia spp.

| Primer | Secuencia (5' - 3') | Referencia |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| A-17 | GTTTGATCATGGCTCAG | |
| A-17, 3-17, ER323-341 | CTACGGGAGGCAGCAGCAG TC | |
| ER757-775 | TAGTCCACGCTGTAAACG | Perez et al., |
| ER1043-1062 | TA AGTCCCGACAACGAGC | 1996 |
| ER864-846 | GAGTTTTAGTCTTGCGAC C | |
| ER493-476 | GTATTACCGCGGCGCTG | |
| ERB2 | CTC TCC CGG ACT CTA GTC TGG C | Engvall et al., |
| 593II | GTT TGA TCC TGG CTC AGG AYD AAC G | 1996 |
| EC1 | TTA- TAGCCTCTGGCTATAGG | McBride et al., |
| EC2 | CACTTTTAACTTACTAGTCC | 1996 |
| ECP1 | GGTAA- TACTGTATAATCCCC | |
| HE3 | TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT | |
| Eh-out1 | TTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACG | |
| Eh-out2 | CACCTCTACACTAGGAAT TCCGCTATC | |
| Eh-gs1 | GTAATAACTGTATAATCCCTG | |
| Eh-gs2 | GTACCGTCATTATCTTCCCTA | |
| ECA30-384S | ATAAACACGCTGACTTTACTGTTCC | |
| ECA30-387S | AACACGCTGACTTTACTGTTCC | Stich et al., |
| ECA30-390S | ACGCTGACTTTACTGTTCCAAAC | 2002 |
| ECA30-351S | AACATGATTGGGATGGAAGTC | |
| ECA30-350S | AACATGATTGGGATGGAAGTC | |
| ECA30-356S | GATTGGGATGGAAGTCCAATAC | |
| ECA30-388S | ACACGCTGACTTTACTGTTCCAAAC | |
| ECA30-282S | GTGTCTCACATTTTGGTAGCTTCTC | |
| ECA30-355S | TGATTGGGATGGAAGTCCAATAC | |
| ECA30-353S | CATGATTGGGATGGAAGTCCAATAC | |
| ECA30-278S | CCAAGTGTCTCACATTTTGGTAGC | |

En 2009 se realizó un estudio que buscaba estimar la sensibilidad y especificidad relativa de la PCR en suero de 38 caninos infectados naturalmente con Ehrlichiosis Monocítica Canina e investigar la asociación entre la seropositividad por PCR y los títulos mediante IFA; obteniéndose una amplificación de la secuencia del gen 16S rRNA del 63.1%, en comparación con la identificación de títulos de los 34 positivos por PCR que fue inferior indicando que el DNA de la Ehrlichia puede estar circulando en sangre aún antes de que el individuo desarrolle títulos de anticuerpos. Además se evaluó el efecto del volumen de la muestra y el hecho que estuvieran o no hemolizadas, determinando que el volumen no era estadísticamente significativo sobre la variación de los resultados; en cuanto a la hemólisis, tampoco generó resultados significativos y al relacionar las dos técnicas determinaron que la sensibilidad con PCR fue menor que con IFA (Mylonakis, Siarkou, Leontides, Bourtzis-Hatzopoulou, Kontos, & Koutinas, 2009).

Desde la perspectiva de los estudios que se han realizado a nivel mundial, se evidencian distintos contextos relacionados con las técnicas diagnósticas como los tipos de muestras, las variables analizadas y los resultados obtenidos. Se reportó un estudio en Australia para determinar la prevalencia de infecciones transmitidas por garrapatas en poblaciones aborígenes de caninos tradicionalmente positivos a *Babesia vogeli* y a *A. platys*. En este estudio se evaluaron 39 perros, utilizando PCR y serología mediante ELISA obteniéndose solo un canino (3%) PCR positivo con *E. canis* (Barker, Langton, Helps, Brown, Malik, Shaw, & Tasker, 2012). En Malasia se llevó a cabo un estudio molecular en un total de

500 caninos, cuyas muestras se recolectaron en clínicas veterinarias y refugios de perros, se usaron *primers* de genes específicos, encontrando sólo 10 perros positivos para *E. canis*, el análisis filogenético evidenció agrupamiento con otras cepas de *E. canis* de diferentes regiones (Nazari, M., Lim, S. Y., Watanabe, M., Sharma, R. S. K., Cheng, N., & Watanabe, M., 2013).

Investigaciones con poblaciones más extensas como la desarrollada en Estados Unidos con un total de 8662 perros, en diferentes colegios veterinarios, prácticas privadas y laboratorios de diagnóstico en regiones de Norte América, probaron muestras para *E. canis*, usando pruebas de ELISA, mostrando una seroprevalencia para *E. canis* de 0.8% (Beall et al., 2012).

Estudios moleculares adicionales determinaron los epítopes relacionados con proteínas antigénicas de *E. canis* mapearon 24 aminoácidos, evaluándose las características antigénicas de los mismos (Aguar et al., 2013).

Algunos investigadores han ampliado el alcance de sus estudios más allá de los caninos, reportando a partir de la hemolinfa de *R. sanguineus* de garrapatas hembras, colectadas en animales, 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 (Zweygarth, Cabezas-Cruz, Josemans, Oosthuizen, Matjila, Lis, & Passos, 2014).

Un estudio molecular realizado en la escuela de Veterinaria de la Universidad Ross en Estados Unidos mediante la técnica de PCR evaluaron la presencia de *E. canis*, *Babesia spp*,

Anaplasma spp y *Hepatozoon spp*, en sangre, encontrando evidencia de infección con *E. canis* (27%; 46/170), *Babesia spp.* (24%; 90/372), *B. canis vogeli* (12%; 43/372) y *B. gibsoni* (10%; 36/372), *A. platys* (11%; 17/157) y *H. canis* (6%; 15/266). (Kelly, Xu, Lucas, Loftis, Abete, Zoli, & Wang, 2013).

Dado 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 que, en la primera aproximación al paciente el extendido en sangre y la citología de nódulos linfáticos en la fase aguda de la enfermedad mediante la visualización de mórulas permiten el diagnóstico inicial de la enfermedad.

En estadios crónicos de la enfermedad cuando la población leucocitaria del animal ha disminuido consecuentemente con la enfermedad la determinación visual puede dificultarse debido a los pocos monocitos que se hallarán en los extendidos, por lo cual en estos casos técnicas como la PCR, Elisa e IFA permiten la identificación de estos pacientes. Sin embargo en los estadios iniciales de la enfermedad cuando aún no se ha parasitado en totalidad el sistema sanguíneo del animal o en los casos en los cuales se busca determinar la eficacia del tratamiento la técnica de PCR es la prueba confirmatoria a seleccionar.

Cabe anotar que para el diagnóstico de esta enfermedad es necesario contar tanto con las pruebas serológicas, que identifican la presencia de anticuerpos de *Ehrlichia* en pacientes con signos clínicos, y con las pruebas de diagnóstico directo, que permiten la identificación y diferenciación de especies de *Ehrlichia* (Benavides & Ramírez, 2003). 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.

Materiales y métodos

Estructura y diseño

Este estudio se estructuró como una investigación observacional transversal no experimental con muestreo por conveniencia (no aleatorio). Los animales sometidos al estudio fueron pacientes de la Clínica Veterinaria del Tolima y de la Clínica Veterinaria de Pequeños Animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, las cuales se encuentran ubicadas en la ciudad de Ibagué (Tolima, Colombia), localizada en el centro del país a una altura promedio de 1285 m.s.n.m. y con una temperatura promedio de 28°C. Las técnicas paraclínicas se realizaron en la Clínica de la Universidad del Tolima, ubicada en la ciudad de Ibagué. Las pruebas moleculares se llevaron a cabo en los Laboratorios de la Universidad de La Salle, en la ciudad de Bogotá.

Para el cumplimiento de los objetivos de la presente propuesta, se seleccionaron 40 caninos (machos y hembras) entre los 2 y 14 años de edad, de cualquier raza y peso, que presentaron signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina como son mucosas pálidas, tiempo de llenado capilar prolongado, fiebre, pérdida ponderal, linfadenopatía, uveítis, petequias o epistaxis según lo reportado por Faria, Dagnone, Munhoz, João, Pereira, Machado,

& Tinucci-Costa, (2010). Adicionalmente en la historia clínica de los caninos seleccionados se confirmó la presencia de garrapatas en el animal. Esta información fue recolectada en el formato de historia clínica que se presenta en el anexo 1. El muestreo por conveniencia se baso en el costo de las pruebas moleculares.

Como grupo control se seleccionaron 10 caninos clínicamente sanos. A los 50 pacientes seleccionados se les realizó un examen clínico general que incluyó determinación de constantes fisiológicas, valoración sistémica, coloración de mucosas y tiempo de llenado capilar.

De estos pacientes se obtuvo una muestra de sangre de 3 ml en un tubo con anticoagulante (EDTA) y en un tubo seco con el sistema vacutainer; esta muestra se mantuvo en reposo durante 5 minutos y posterior a la sedimentación de los eritrocitos se tomo la capa blanca de la muestra, adicionalmente, se obtuvo una gota de sangre periférica del pabellón auricular para el extendido de la muestra sobre una lámina portaobjetos. A estas muestras se realizaron las siguientes pruebas, cuadro hemático, frotis directo y frotis de capa blanca con la coloración Giemsa. La cantidad de sangre restante se almacenó a -20°C para los análisis moleculares (Tami, 2003).

Metodología para la realización del frotis sanguíneo

Se utilizaron láminas portaobjetos de vidrio limpias y sin grasa, las cuales se sumergieron previamente en una solución al 90% de alcohol etílico y 5% de acetona en agua destilada, posteriormente se secaron completamente pasado un día.

Se realizó una punción en el pabellón auricular de cada canino obteniéndose una gota de sangre la cual fue depositada directamente en un extremo de la lamina portaobjetos, posteriormente se colocó una segunda lámina con una inclinación de 45° con respecto a la primera desplazándose hacia atrás hasta tomar la gota de sangre permitiendo que la muestra se distribuyera por el borde de la lámina para ser desplazada a lo largo del portaobjetos hasta que quedó extendida por completo. Posteriormente se secó el extendido al aire con movimientos rápidos de vaivén (Benavides, 2008)

Cada lámina fue fijada en metanol 100% durante tres minutos (mediante inmersión), se secándose nuevamente. Se realizó la coloración de la lámina con Giemsa, (mediante inmersión) en un recipiente con 40 ml; se añadió solución Buffer y dos gotas de Triton X al 5% en un segundo recipiente, en seguida se colocaron las láminas fijadas dentro de la solución del colorante (Giemsa al 2.5%), durante 45 minutos, posteriormente se retiraron la láminas del recipiente inicial y se llevaron al segundo, que contenía la solución buferada, esta operación se repitió tres veces y finalmente se secaron al aire en una gradilla en posición vertical. Cada placa fue evaluada en 10 campos, abordando la totalidad de la misma.

Análisis bioinformáticos

Estos análisis se realizaron previo a las pruebas moleculares con el fin de identificar las secuencias, los tamaños en pares de bases (bp) y la posición de los genes de interés y de verificar la especificidad de los *primers* previamente reportados. Utilizando los recursos *Nucleotide y Gene* y la base de datos del *National Center for Biotechnology Information*. Las

secuencias seleccionadas de los genes de interés fueron alineadas con el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) el cual es un programa informático de alineamiento de secuencias RNA, DNA o proteínas, el cual compara una secuencia problema con las bases de datos disponibles identificando similitudes o alineamientos. Se utilizaron los recursos Nucleotide y Gene para determinar la secuencia, el tamaño y la posición de los genes.

Extracción de ADN a partir de sangre completa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la extracción del ADN del parásito a partir de las muestras de sangre completa de los caninos seleccionados se empleó el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit® (Cat. No. 51104 QIAGEN). Como control positivo se utilizó una muestra de sangre obtenida a partir de un canino infectado experimentalmente con *E. canis* de un estudio previo realizado por Rodríguez-Mallon, Bechara, Zacarias, Benavides-Ortiz, Soto-Rivas, Gomez-Ramirez, Jaimes-Olaya, & Estrada en 2013.

Para la detección de *E. canis* se emplearon *primers* específicos diseñados sobre la secuencia del gen 16S rRNA reportados previamente (Gal et al., 2008). También se emplearon *primers* para la detección del género *Ehrlichia* diseñados sobre la secuencia del gen 16S rRNA (Gal et al., 2008). Las secuencias y el tamaño de los productos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Secuencias de nucleótidos y tamaños de los productos de los primers específicos empleados para la detección de E. canis (Gal et al., 2008).

| Patógeno y gen de interés | Primer | Secuencia (5´ a 3´) | Tamaño del producto (bp) |
|---|---------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> (16SrRNA) | ECA | AACACATGCAAGTCGAACGGA | 400 |
| | HE3 | TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT | |
| <i>Ehrlichia</i> género (16SrRNA) | EHR16SD | GGTACCYACAGAAGAAGTCC | 345 |
| | EHR16SR | TAGCACTCATCGTTTACAGC | |

La reacción de PCR se realizó siguiendo el proceso descrito por Gal et al. (2008), con 3 ml de ADN molde obtenidos a partir de la extracción previa, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 12.5 pmol de cada primer y 1.25 u de Taq DNA polimerasa en un buffer de reacción 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.3 y 1.5 mM MgCl), para un volumen final de 25 µl. Para la amplificación se usó una PCR *Touchdown* que permite obtener una mayor amplificación de la secuencia del gen (Gal et al., 2008) bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 3 minutos, dos ciclos a 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, dos ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, dos ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, dos ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos, dos ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos, treinta y nueve ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y una

extensión final de 72°C por 3 minutos. El termociclador usado en este estudio fue el C1000 Touch™ Thermal Cycler de Bio-Rad.

La especificidad de los *primers* y el tamaño de los productos se confirmaron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con EZ Vision® y visualizados con transiluminador de luz UV.

Resultados

Signos clínicos y análisis de cuadro hemático de los pacientes

Con base en la metodología, como criterios de inclusión se utilizaron algunos de los signos clínicos compatibles con la Ehrlichiosis Monocítica Canina como mucosas pálidas, tiempo de llenado capilar prolongado, fiebre, pérdida de peso, linfadenopatía, uveítis, petequias o epistaxis. El signo clínico más común en los caninos previamente seleccionados fue la linfadenopatía (50%), seguido de la pérdida de peso (36%); el signo clínico de menor presentación fue la uveítis (2%). Los porcentajes de presentación de los signos clínicos que se utilizaron como criterios de inclusión en los 40 pacientes se muestran en la figura 2. De los 50 caninos muestreados, se encontró una mayor proporción de machos con sintomatología correspondiente a los criterios de inclusión (33 machos y 17 hembras). También se encontró un rango de edad desde los 3 meses a los 16 años, distribuidos en 14 razas y perros mestizos. En los 50 caninos muestreados se evidenció la presencia de garrapatas en el momento de la consulta, como parte del cumplimiento de los criterios de inclusión.

En las muestras sanguíneas recolectadas de los animales seleccionados para este estudio se realizó análisis de cuadro hemático. Los promedios obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados así como los rangos se muestran en la tabla 6. Los hallazgos más llamativos fueron la presentación de leucocitosis en el 57,5% de los pacientes con signos clínicos (23/40), seguido de anemia (17/40) en su mayoría normocítica normocrómica (15/17). Uno anemia microcítica hipocrómica y dos anemia normocítica hipocrómica.



Figura 2. Distribución en porcentaje de los signos clínicos utilizados como criterios de inclusión en los caninos de estudio (pacientes y grupo control).

De los animales sospechosos de la enfermedad por cuadro clínico, el 22,5% (9/40) manifestaron trombocitopenia. La alteración menos común en los caninos con signos clínicos fue leucopenia, la cual se evidenció en un paciente.

Tabla 6

Resultados del cuadro hemático de caninos residentes en Ibagué (Tolima), con signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina.

| Parámetro (unidades) | Promedio | Rangos | Rangos de referencia [†] | Número de pacientes con alteraciones en los valores |
|--|----------|-------------|-----------------------------------|---|
| Volumen corpuscular medio (VMC) (fL) | 69,15 | 60.6 – 77,7 | 64-74 | 0 |
| Hematíes (10 ⁶ /μL) | 6,25 | 3,2- 9,3 | 5,4- 7,8 | 11 |
| Hematocrito (%) | 32,5 | 7- 58 | 37-52 | 17 |
| Contenido corpuscular medio de hemoglobina (HCM) (pg) | 20 | 15 - 25 | 22- 27 | 1 |
| Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g/dL) | 28,3 | 21,6 - 35 | 32-36 | 0 |
| Hemoglobina (g/dL) | 19,5 | 2,0 - 19 | 13-19 | 17 |
| Plaquetas (X 10 ⁹ μL) | 395 | 90 - 700 | 160-430 | 9 |
| Leucocitos (X 10 ⁹ μL) | 30,7 | 1,4 - 60 | 6,0 - 17 | 23 |
| Neutrófilos en banda (X 10 ⁹ μL) | 0,65 | 0 -1,3 | 0 – 0,3 | 0 |
| Eosinófilos (X 10 ⁹ μL) | 0,7325 | 0,065- 1,4 | 0,1 – 1,25 | 8 |
| Linfocitos (X 10 ⁹ μL) | 11,08 | 0,16 - 22 | 1,0 – 4,8 | 11 |
| Monocitos (X 10 ⁹ μL) | 5,0032 | 0,0064 - 10 | 0,15 – 1,35 | 10 |

Nota: Valores de referencia obtenido de Meyer, J., & Harvey, J. 2007.

Resultados del cuadro hemático de caninos residentes en Ibagué (Tolima), sin signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina.

| Parámetro (unidades) | Promedio | Rangos | Rangos de referencia [†] | Número de pacientes con alteraciones en los valores |
|--|----------|-------------|-----------------------------------|---|
| Volumen corpuscular medio (VMC) (fL) | 69,15 | 60.6 – 77,7 | 64-74 | 0 |
| Hematíes (10 ⁶ /μL) | 6,25 | 3,2- 9,3 | 5,4- 7,8 | 11 |
| Hematocrito (%) | 32,5 | 7- 58 | 37-52 | 17 |
| Contenido corpuscular medio de hemoglobina (HCM) (pg) | 20 | 15 - 25 | 22- 27 | 1 |
| Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g/dL) | 28,3 | 21,6 - 35 | 32-36 | 0 |
| Hemoglobina (g/dL) | 19,5 | 2,0 - 19 | 13-19 | 17 |
| Plaquetas (X 10 ⁹ μL) | 395 | 90 - 700 | 160-430 | 9 |
| Leucocitos (X 10 ⁹ μL) | 30,7 | 1,4 - 60 | 6,0 - 17 | 23 |
| Neutrófilos en banda (X 10 ⁹ μL) | 0,65 | 0 -1,3 | 0 – 0,3 | 0 |
| Eosinófilos (X 10 ⁹ μL) | 0,7325 | 0,065- 1,4 | 0,1 – 1,25 | 8 |
| Linfocitos (X 10 ⁹ μL) | 11,08 | 0,16 - 22 | 1,0 – 4,8 | 11 |
| Monocitos (X 10 ⁹ μL) | 5,0032 | 0,0064 - 10 | 0,15 – 1,35 | 10 |

Nota: Valores de referencia obtenido de Meyer, J., & Harvey, J. 2007.

Con respecto a los caninos del grupo de animales no sospechosos de la enfermedad, cuatro de los 10 animales presentaron anemia normocítica normocrómica, un animal presentó incremento en el recuento plaquetario y uno con disminución del recuento plaquetario; adicional a esto un animal presentó linfopenia.

En los resultados de la lectura de los extendidos sanguíneos, cada placa se evaluó en 10 campos, abordando la totalidad de la misma, en los que no se observaron mórulas características de *Ehrlichia*. Al análisis fueron evidentes cambios en la morfología como hipocromía celular en 17 animales, tres muestras con anisocitosis, dos con crenación y dos caninos con poiquilocitosis.

Análisis bioinformáticos de los genes y *primers* seleccionados en el estudio

Durante varias décadas los científicos han reportado en el NCBI el resultado de sus investigaciones arrojando información variada entre la cual se encontraron múltiples sinónimos del agente conocido como *E. canis*; entre los nombres se hallaron: *Rickettsia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935), *Ehrlichia (Rickettsia) canis* (Moshkovski, 1937). *Nicollea canis* (Macchiavello, 1947) y *Kurlovia (Ehrlichia) canis* (Zhdanov, 1953) (Breed, R & Petraitis, A, 1954).

El gen 16s rRna esta investigación se ha reportado en diferentes géneros de *Ehrlichia*, encontrando un total de 2685 secuencias de las cuales 213 coinciden con reportes de secuencias parciales de *Ehrlichia canis* (Anexo 2) y ocho secuencias completas que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Secuencias completas reportadas del gen 16S rRNA para Ehrlichia canis.

| Descripción | Configuración | Identificación en GeneBank | Referencia |
|---|-----------------------|--|------------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.623 bp ADN lineal. | Accession: EU106856.1 GI: 156787464. | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN4 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.623 bp ADN lineal. | Accession: EU143637.1 GI: 157645011. | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.623 bp ADN lineal. | Accession: EU143636.1 GI: 157645010. | Hsieh et al., 2010 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.623 bp ADN lineal. | Accession: EU123923.1 GI: 157102080. | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN17 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.623 bp ADN lineal. | Accession: EU139493.1 GI: 161376759. | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN18 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.623 bp ADN lineal. | Accession: EU178797.1 GI: 161702767. | Hsieh et al., 2008 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa ECAN_Bkk_07 gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.498 bp ADN lineal. | Accession: EU263991.1 GI: 161177101. | Ariyawutthiphan et al., 2007 |
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake cepa Jake gen 16S RNA ribosomal, secuencia completa. | 1.485 bp linear rRNA. | Accession: NR_074283.1 GI: 444303861. | Palenik et al., 2013 |

Tabla 8

Alineación de primers mediante BLASTn con las secuencias de Ehrlichia canis reportadas en GeneBank.

| Descripción | Query cover (%) | E-value | Ident (%) | Número de identificación |
|--|-----------------|----------|-----------|--------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake cepa Jake 16S ARN ribosomal, secuencia completa. | 100 | 2.00E-06 | 100 | NR_074283.1 |
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake, genoma completo. | 100 | 2.00E-06 | 100 | CP000107.1 |
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake gen ARNt-Glu-TTC-1-1. | 38 | 142 | 100 | LK006379.1 |
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake tmARN gen Ehrli_canis_Jake. | 33 | 561 | 100 | HG528633.1 |
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake ARNm Ehrli_canis_Jake, dos-piezas ARNtm, ARN codificador. | 33 | 561 | 100 | HG791632.1 |
| <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake RNAt-gen Lys-TTT-1-1. | 33 | 561 | 100 | LK006390.1 |
| TPA: <i>Ehrlichia canis</i> str. Jake tRNA-Arg-ACG-1-1 gene. | 33 | 561 | 100 | LK006371.1 |

Mediante la herramienta BLASTn se realizó la alineación de los *primers* utilizados en el estudio, corroborando que los *primers* seleccionados (ECA AAC ACA TGC AAG TCG

AAC GGA y HE3 TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT) son compatibles con la bacteria *E. canis*, evidenciando 100% de similitud de la secuencia con los genomas reportados como se muestra en la tabla 8.

Análisis moleculares

Las muestras fueron sometidas a PCR Touchdown con los *primers* EHR16SR/EHR16SD y los productos obtenidos fueron confirmados por electroforesis. En la figura 3 se muestra una imagen representativa de los geles de agarosa con las ampliaciones específicas de los genes de interés. Cada muestra identificada como positiva corresponde a la formación de una banda en la electroforesis del tamaño esperado para *Ehrlichia*.

Con base en los resultados de PCR se encontraron 64% animales positivos (32/50), de los cuales 29 corresponden al grupo de animales con sintomatología. Así mismo se detectaron cinco animales positivos a los primers que identifican *Ehrlichia* género (EHR16SD/HR16SR), de los cuales un animal pertenecía al grupo control.

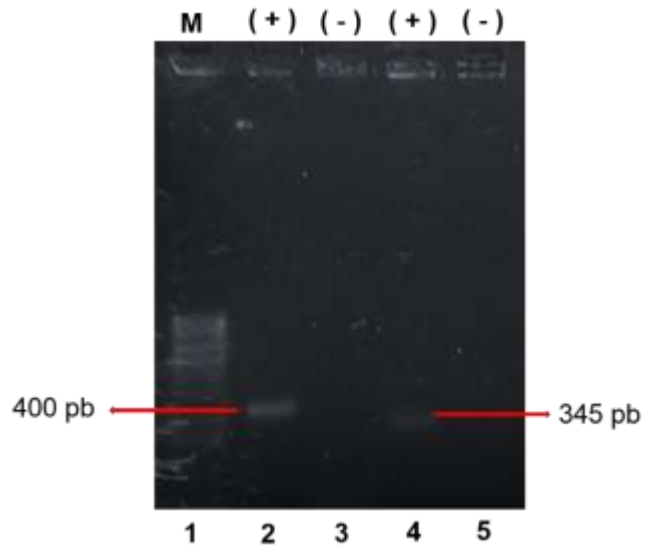


Figura 3. Imagen representativa de los genes 16S rRNA de *Ehrlichia canis* (400 pb) y *Ehrlichia genero* (345 pb) en muestras de sangre de caninos infectados experimentalmente con cepas de *Ehrlichia canis*. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con EZ vision[®] y visualizados con un transiluminador de luz UV. En la electroforesis se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (M). 1: Marcador de peso molecular. 2: Control positivo del gen 16S rRNA de *E. canis* (400 pb). 3: Control negativo (no se observa banda). 4: Control positivo del gen 16S rRNA del género *Ehrlichia* (345 pb). 5: Control negativo (no se observa banda).

Una vez obtenidos los resultados de la prueba de PCR se analizaron los animales positivos y negativos a *E. canis* y *Ehrlichia* género con los hallazgos hematológicos más relevantes según lo evidenciado en los cuadros hemáticos de los pacientes. Estos resultados se muestran en la tabla 9.

El signo clínico con mayor presentación en los caninos positivos a *Ehrlichia* por PCR fue la linfadenopatía (60%), seguido de la pérdida de peso (48%). La distribución de los signos clínicos en los caninos positivos por PCR se muestra en la figura 4.

Teniendo en cuenta que la literatura reporta que el hallazgo más común en los cuadros hemáticos de los animales positivos a Ehrlichiosis Monocítica Canina es la trombocitopenia, éste se analizó frente a los resultados de PCR. De esta forma, los pacientes positivos se dividieron en tres grupos: animales sin alteración plaquetaria, trombocitopenia moderada y trombocitopenia marcada (Bulla, Takahira, Araujo, AparecidaTrinca, Lopes, & Wiedmeyer, 2004); los resultados de este análisis se muestran en la tabla 10.

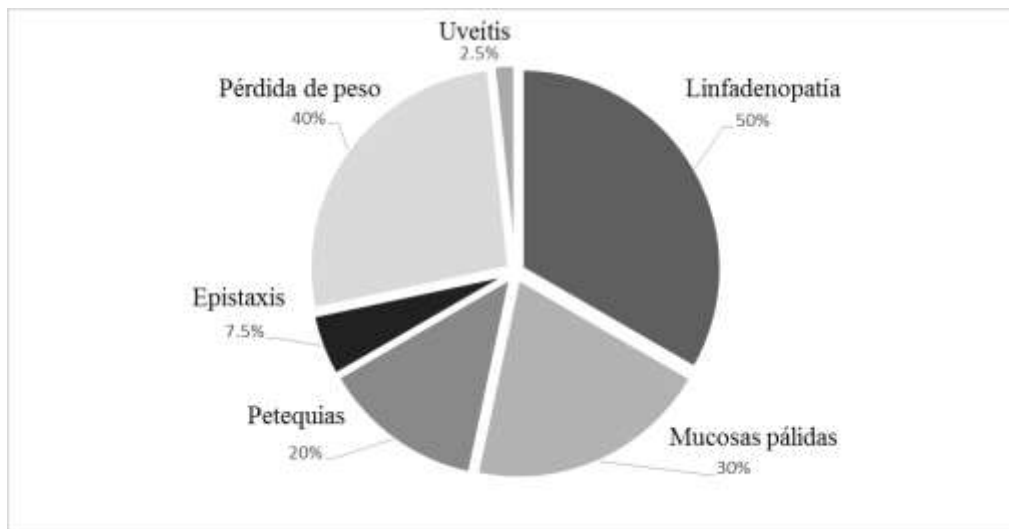


Figura 4. Distribución de los signos clínicos presentados en los caninos positivos por PCR a *Ehrlichia canis*.

Tabla 9

Principales hallazgos hematológicos en los caninos que presentaron signos clínicos de enfermedad frente a los resultados de la prueba de PCR para Ehrlichia canis y Ehrlichia género.

| Hallazgos hematológicos (n) | PCR | | | |
|-----------------------------|------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | <i>Ehrlichia canis</i> | | <i>Ehrlichia</i> género | |
| | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| Trombocitopenia (9) | 4 | 5 | 1 | 8 |
| Anemia (17) | 9 | 8 | 1 | 16 |
| Leucocitosis (7) | 5 | 2 | 1 | 6 |
| Leucopenia (4) | 2 | 2 | 1 | 3 |

Tabla 10

Grado de trombocitopenia presentada por los pacientes positivos mediante la prueba de PCR a Ehrlichia canis y Ehrlichia género.

| | PCR | |
|--|---|---|
| | <i>Positivos a Ehrlichia canis</i> (27) | <i>Positivos a Ehrlichia genero</i> (4) |
| No Trombocitopénicos < 200.000/ ul | 1 | - |
| Trombocitopenia moderada 100.000 - 200.000 /ul | 2 | 1 |
| Trombocitopenia marcada > 100.000 /ul | 1 | - |

En resumen, 32 de los pacientes positivos a *E. canis*, el 29 de los animales presentaban signos clínicos y el 13 % presentó trombocitopenia. Vale la pena resaltar que de los pacientes positivos tres pertenecían al grupo control.

Discusión

El diagnóstico de la Ehrlichiosis Monocítica Canina debe realizarse con base en la anamnesis, los signos clínicos y los resultados de pruebas de laboratorio, debido a que las diferentes fases de la enfermedad y las múltiples manifestaciones clínicas que se presentan en los pacientes pueden llevar a sobre o subdiagnosticar esta patología. Se sospecha de la enfermedad cuando el animal ha estado expuesto a garrapatas y adicionalmente están presentes los signos clínicos y las alteraciones hematológicas reportadas en la literatura. Sin embargo, la confirmación definitiva de la presencia del agente requiere de la visualización de mórulas en extendidos sanguíneos o de la realización de pruebas moleculares que identifiquen secuencias genéticas concordantes con el genoma de la bacteria (Kledmanne et al., 2009).

En la presente investigación, la linfadenopatía fue el signo clínico de mayor presentación en los caninos de estudio así como en los pacientes positivos a *E. canis* por PCR. Este hallazgo suele ser común en animales con Ehrlichiosis Monocítica Canina según lo reportado por Rikihisa et al. (1992) y puede presentarse como respuesta del sistema inmune ante el agente. El segundo signo clínico de mayor presentación en el grupo de pacientes fue la pérdida de peso, la cual puede deberse a la anorexia que caracteriza a las infecciones por *E. canis* (Skotarczak, 2003). Este signo clínico es de relevancia diagnóstica ya que es una de las principales alertas de alteración sistémica en el individuo, que lleva al clínico a la búsqueda de la causa de la pérdida de peso del paciente. Adicionalmente, en la fase crónica de la Ehrlichiosis Monocítica Canina la pérdida de peso es un hallazgo común (Waner & Harrus,

1997). El signo clínico menos común tanto en los pacientes sospechosos de la enfermedad, así como en los animales positivos al agente fue la uveítis; este hallazgo está acorde con lo reportado en estudios previos los cuales indican que la prevalencia de lesiones oculares en la Ehrlichiosis Monocítica Canina es baja con un rango de 10 a 15% (Martin, 1990) y la severidad del compromiso ocular varía entre pacientes (Stiles, 2000).

En el examen hematológico, los hallazgos más llamativos fueron la presentación de leucocitosis en el 57.5% de los pacientes con signos clínicos. Este hallazgo fue similar al reportado por Nakaghi, Machado, Costa, Andrè, & Baldani (2008), quienes atribuyeron la leucocitosis a la hiperplasia de la médula ósea. El segundo hallazgo hematológico relevante es la anemia, en su mayoría normocítica normocrómica, la cual se ha reportado en la fase crónica de la enfermedad y se ha atribuido a la supresión de la producción de eritrocitos (López, Castillo, Muñoz, & Hildebrant, 1999). De los animales sospechosos de la enfermedad por cuadro clínico, el 22.5% manifestaron trombocitopenia que se ha reportado de forma frecuente en pacientes con Ehrlichiosis Monocítica Canina (Bulla et al., 2004). Este hallazgo explicaría la presencia de signos clínicos como epistaxis y petequias en algunos de los pacientes muestreados.

En el presente estudio no se encontraron mórulas en los extendidos de sangre; sin embargo se identificó el genoma del agente en el 67.5% de los pacientes con signos clínicos. Estudios previos han reportado que no es frecuente encontrar mórulas de *E. canis* en el citoplasma de las células mononucleares debido a la baja parasitemia que ocurre en las

infecciones de forma natural, lo cual puede deberse a que la bacteria permanece alojada en el bazo más tiempo que en la sangre; en contraste en el trabajo de Elias (1992) se detectaron corpúsculos de inclusión en el 88% de los casos sintomáticos y mórulas en el 4% de ellos. En el estudio de Brasil de 40 casos sintomáticos se halló mórulas en 17 muestras de bazo y dos de extendidos sanguíneos (Elias, 1992; Faria, Dagnone, Munhoz, Joao, Pereira, Machado, & Tinucci-Costa, 2010).

El 63% de los animales muestreados en esta investigación fueron positivos a *E. canis* mediante PCR. Esta frecuencia de positividad por pruebas moleculares puede deberse a la mayor población del vector en la zona de estudio (Kledmanee et al., 2009; Silva et al., 2008) y a las características de construcción de hogares y demás estructuras donde habitan los animales; estas condiciones pueden repercutir en la presencia del agente en caninos mediante la sobreexposición al vector. Cabe resaltar que en los caninos seleccionados no se caracterizaron los ectoparásitos ni se tomó en consideración las características del hogar donde éstos habitan. Los estudios de caracterización de vectores realizados en el país han reportado la presencia de *R. sanguineus*, *R. microplus* y *A. cajenense* las cuales se han caracterizado específicamente en la zona de este estudio (Benavides & Ramírez, 2003). Dada la variedad de vectores a nivel mundial que afectan a los caninos es importante caracterizar las garrapatas presentes en el país y en las diferentes zonas, ya que la adecuada caracterización de éstos es un indicativo inicial de los agentes que podrían afectar a los caninos.

Uno de los hallazgos por PCR que generó interés en esta investigación fue el hecho que los animales positivos a *E. canis* no fueran positivos a *Ehrlichia* spp, este comportamiento puede deberse a que los primers usados amplificaron diferentes fracciones de ADN del gen 16S rRNA lo cual pudo presentarse por diferencias en las secuencias de nucleótidos de cepas locales de *E. canis*, de acuerdo a lo reportado por Gal et al. en 2008. El uso del gen 16S rRNA en la identificación de bacterias como marcador genético constitutivo se debe a que este gen está presente en la mayoría de las bacterias, adicionalmente tiene ciertas características como que la función del gen no ha cambiado con el paso del tiempo y que está constituido por 1,500 pares de bases lo que minimiza las fluctuaciones estadísticas (Janda & Abbott, 2007). Como se mencionó en el marco teórico del presente documento existen otros genes para la identificación de *E. canis* como son los genes rRNA 5S y 23S (Mavromatis et al., 2006).

Otro de los resultados por PCR fue la identificación del genoma del agente en tres caninos sin signos clínicos de la enfermedad. Este hallazgo puede estar relacionado con la capacidad de la prueba de detectar la presencia del agente en estadios tempranos de infección o en animales que cursan la fase subclínica de la enfermedad; condiciones en las que no se evidencian signos clínicos (Cartagena, Rios, & Cardona, 2015; Carrillo et al., 2012). Sin embargo, ninguno de los dos eventos anteriores se confirmó en la presente investigación debido al diseño experimental, donde no se consideró el seguimiento clínico de los pacientes. La presencia de agentes sin signos clínicos de enfermedad también puede deberse a un estado de equilibrio entre el proceso infeccioso y la adquisición de inmunidad por parte de los

hospedadores conocido como estabilidad enzoótica (Ríos, Zapata, Reyes, Mejía, & Baena, 2010), aunque no se ha reportado para este agente, si se ha analizado en casos de zonas endémicas de anaplasmosis y babesiosis en Colombia (Benavides, Polanco, Vizcaíno, & Betancurt, 2013). La disponibilidad de una prueba diagnóstica molecular especie específica amplia la posibilidad de realizar un monitoreo de los vectores y de la enfermedad, proporcionando al Médico Veterinario elementos para establecer un tratamiento oportuno mediante el uso del medicamento apropiado en función de microorganismo en una infección simple o mixta.

Con relación a la PCR Touchdown seleccionada para esta investigación se destaca la obtención de múltiples copias del gen de interés, la facilidad de procesar varias muestras sin necesidad de una purificación previa (Luque & Herraéz, 2006) y la obtención de resultados a partir de muestras pequeñas de ADN (Mihoubi, Monbrison, Romeuf, & Moulahem, 2006). Entre las desventajas que ésta presenta se reporta la susceptibilidad frente a las condiciones de temperatura en el laboratorio (Chacón, Barrantes, García, & Rosario, 2010), y la posible contaminación entre muestras cuando se realiza por personal no calificado. Adicionalmente la prueba de PCR touchdown puede ser usada como un método para la confirmación de la eficacia del tratamiento instaurado en el animal. Es importante resaltar que esta prueba de diagnóstico directo identifica la presencia del agente, más no confirma el estado de enfermedad. Como se mencionó al principio de esta discusión el diagnóstico debe realizarse con base en la anamnesis, los signos clínicos y los resultados de pruebas de laboratorio.

Con ayuda de las herramientas bioinformáticas se logró determinar la concordancia de las secuencias usadas con el genoma de la bacteria, ratificando de esta manera la positividad de los resultados de las pruebas de PCR.

Finalmente, de acuerdo a los resultados de la investigación y a las publicaciones pertinentes se debe resaltar la importancia de realizar estudios que aclaren aspectos relacionados con el impacto epidemiológico de las enfermedades transmitidas por garrapatas, así como la determinación de zonas con estabilidad enzoótica.

Lista de referencias

- Adao, D., Herrera, C., Carlos, S., Carlos, R. S., Carlos, E. T., & Rivera, W. L. (2014). Development of multiplex PCR for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Institute of Biology, University of the Philippines, Philippines*.
- Aguiar, D. M., Zhang, X., Melo, A. L. T., Pacheco, T. A., Meneses, A. M. C., Zanutto, M. S., & Labruna, M. B. (2013). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Veterinary Microbiology*, *164*(3-4), 315–321. doi:10.1016/j.vetmic.2013.02.015
- Aguiar, D. M., Hagiwara, M. K., & Labruna, M. B. (2008). In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, *39*(3), 489–493. doi:10.1590/s1517-83822008000300014
- Alexandre, N., Santos, A. S., Nuncio, M. S., Sousa, R. de, Boinas, F., & Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *The Veterinary Journal*, *181*(3), 343–344. doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.025
- Anderson, B E., Dawson, J. E., Jones, D. C. & Wilson, K.H. (1991). *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* *29*(12), 2838-2842.
- Barker, E. N., Langton, D. A., Helps, C. R., Brown, G., Malik, R., Shaw, S. E., & Tasker, S. (2012). Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote

Aboriginal communities in Australia. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 55.

doi:10.1186/1746-6148-8-55

Beall, M. J., Alleman, A. R., Breitschwerdt, E. B., Cohn, L. A., Couto, C. G., Dryden, M. W., & Yabsley, M. J. (2012). Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasites & Vectors*, 5(1), 29.

doi:10.1186/1756-3305-5-29

Belanger, M., Sorenson, H. L., France, M. K., Bowie, M. V., Barbet, A. F., Breitschwerdt, E. B., & Alleman, A. R. (2002). Comparison of serological detection methods for diagnosis of *ehrlichia canis* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3506–3508. doi:10.1128/jcm.40.9.3506-3508.2002

Benavides, J., & Ramírez, G. (2003). Ehrlichiosis canina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16 (3), 268-274.

Benavides, E., Polanco, N., Vizcaíno, O & Betancurt, O. (2013). Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Revista Ciencia Animal de la Universidad de La Salle*,5.

Birchard, S., & Sherding, R. (1994). Enfermedades por Rickettsias. En *Manual clínico de Pequeñas especies*. Mc.Graw Hill (Ed) (pp.146-150).

Borin, S., Crivelenti, L. Z., & Ferreira, F. A. (2009). Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente

infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 566–571.

doi:10.1590/s0102-09352009000300007

Botros, B., Elmolla, M. S., Salib, A. W., Calamaio, C. A., Dash, G. A., & Arthur, R. R.

(1995). Canine ehrlichiosis in Egypt; seroepidemiologic survey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 62, 41–43.

Brouqui, P., & Dumler, J. S. (2002). The immune response to *Ehrlichia chaffeensis*. *Infectious Agents and Pathogenesis*, 163–172. doi:10.1007/0-306-46804-2_10

Bulla, C., Takahira, R. K., Araujo, J. P., Aparecida Trinca, L., Lopes, R. S., & Wiedmeyer, C.

E. (2004). The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*, 35(1), 141–146.

doi:10.1051/vetres:2003038

Cardozo, G. P., Santos, E. V., Fachin, A. L., França, S.C., & Marins M. (2011). A glass bead protocol for recovery of host cell free *Ehrlichia canis* and quantification by Sybr-green real-time PCR. *Biocell*, 35(1), 35-6.

Cardoso, L., Mendão, C., & Madeira de Carvalho, L. (2012). 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. *Parasites & Vectors*, 5(1), 62. doi:10.1186/1756-3305-5-62

Cardoso, L., Costa, Á., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G.

(2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern

Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156(3-4), 199–204.

doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.027

Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H., Nachum-Biala, Y., Lopes, A., Vila-Viçosa, M., & Baneth,

G. (2015). First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from

Portugal. *Parasit Vectors*, 8(1), 144. doi:10.1186/s13071-015-0756-y

Carrillo, L., Betancur, S., Roldán, D., Pérez, J., Galeano, D., Loaiza, E., & Giraldo, C. (2012).

Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7 (2), 38-46.

Cartagena Yarce, L. M. M., Ríos Osorio, L. A., & Cardona Arias, J. A. (2015).

Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Revista de Medicina*

Veterinaria ., (29), 51. doi:10.19052/mv.3446

Chacón, L., Barrantes, K., García, C., & Rosario, A. (2010). Estandarización de una PCR para

la detección del gen invA de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad*

Venezolana de Microbiología, 30(1), 18-23

Chung, Y., Lee, C., and Kamani, J. (2011). First molecular detection and characterization of

Ehrlichia canis in dogs and ticks in Nigeria. *Department of Veterinary Medicine,*

College of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University. Taiwan

- Cocco, R., Sanna, G., Cillara, M. G., Tola, S., Ximenes, L., Pinnarapaglia, M. L., & Masala, G. (2003). Ehrlichiosis and Rickettsiosis in a Canine Population of Northern Sardinia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 126–130. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07350.x
- Cohn, L. A. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(4), 863–884. doi:10.1016/s0195-5616(03)00031-7
- Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1(1), 25. doi:10.1186/1756-3305-1-25
- Das, M. K., Dubey, R., Kukreti, K., Sharma, P., & Rana, A.K. (2001). Standardization of nested PCR for amplification of 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis*. *Biotechnology, Central Military Veterinary Laboratory*.
- De Oliveira, L. S., Mourão, L. C., Oliveira, K. A., Agostini, M. da M., de Oliveira, A. C., de Almeida, M. R., & Mafra, C. (2009). Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 53–54. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02175.x
- Desai, A., Lee, M. J., Li, Y. H., Ryu, D. H., Chae, J. S., & Park, J. H. (2006). First report of *Ehrlichia canis* from dog ticks from India by using nested PCR. *Veterinary Internal Medicine, Chonbuk National University*. South Korea.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., & Pérez-Sánchez, R. (2013). Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva

of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), 301–314.

doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.019

Diniz, P., Otranto, D., De Caprariis, D., & Breitschwerdt, E. B. (2008). Molecular characterization of *Anaplasma platys*, *Bartonella spp.* and *Ehrlichia canis* in dogs from southern Italy. *Department of Clinical Sciences, Intracellular Pathogens Research Laboratory*, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, USA

Donatien, A., & Lestoquard, F. (1935). Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien.

Bulletin of the exotic Pathology Society 28, 418–419.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (2001). 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*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 2145-2165.

doi: 10.1099/00207713-51-6-2145

Dumler, J. S., Madigan, J. E., Pusterla, N., & Bakken, J. S. (2007). Ehrlichioses in Humans:

Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clinical Infectious*

Diseases, 45(Supplement 1), S45–S51. doi:10.1086/518146

- Eiras, D. F., Craviotto, M. B., Vezzani, D., Eyal, O., & Baneth, G. (2013). First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(2), 169–173. doi:10.1016/j.cimid.2012.11.008
- Engvall, E., Pettersson, B., Persson, M., Artursson, K., & Johansson, K. (1996). A 16S rRNA-Based PCR Assay for Detection and Identification of Granulocytic Ehrlichia Species in Dogs, Horses, and Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2170–2174.
- Elias, E. (1992). Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *Journal of Small Animal Practice*, 33(11), 540–543. doi:10.1111/j.1748-5827.1992.tb01048.x
- Ettinger, S., & Feldman, E. (1997). Tratado de Medicina Interna Veterinaria, Enfermedades del perro y el gato. (Ed). Intermédica, (pp. 470-484).
- Faburay, B., Munstermann, S., Geysen, D., Bell-Sakyi, L., Ceesay, A., Bodaan, C., & Jongejan, F. (2005). Point Seroprevalence Survey of *Ehrlichia ruminantium* Infection in Small Ruminants in The Gambia. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(4), 508–512. doi:10.1128/cdli.12.4.508-512.2005
- Faria, J. L. M., Dagnone, A. S., Munhoz, T. D., João, C. F., Pereira, W. A. B., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2010). *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 19(02), 98–102. doi:10.4322/rbpv.01902006

- Ferreira, R. F., Cerqueira, A. de M. F., Castro, T. X. de, Ferreira, E. de O., Neves, F. P. G., Barbosa, A. V., & Almosny, N. R. P. (2014). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 23(3), 301–308. doi:10.1590/s1984-29612014055
- Ferreira, R. F. (2012). Clinical and hematological findings in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis* and *E. platys*. *Patologia Clinica, Universidade Federal Rio de Janeiro*. Brasil.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2008). Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*, 175(2), 212–217. doi:10.1016/j.tvjl.2007.01.013
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*, 3(1), 33. doi:10.1186/1756-3305-3-33
- Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., & Horak, I. (2014). Individual Species Accounts. En Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., & Horak, I., (Eds). *The Hard Ticks of the World (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. (Ed.) Springer; (pp. 379).
- Haseway, M.Y. (2005). Dinamica da infeccao experimental de caes por *Ehrlichia canis*:

aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular. Tese

(Doctorado) 134. doi:10.11606/t.10.2005.tde-18042007-111955

- Hidalgo, M., Vesga, J., Lizarazo, D., & Valbuena, G. (2009) Short report: A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chaffeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6),1029-30.
- Hildebrandt, P. K., Conroy, J. D., McKee, A. E., Nyindo, M. B. A., & Huxsoll, D. L. (1973). Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infection and Immunity*, 7(2), 265–271.
- Hsieh, Y.-C., Lee, C.-C., Tsang, C.-L., & Chung, Y.-T. (2010). Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. *Veterinary Microbiology*, 146(1-2), 70–75. doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.013
- Hori-Oshima, S., Tinoco-Gracia, L., Barreras-Serrano, A., Moro, M., & Vinasco, J. (2007). Molecular evidence of *Ehrlichia canis* in dogs in a Mexico-US border. *Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV), Universidad Autónoma de Baja California, México*.
- Huang, X.-Q., & Cloutier, S. (2007). Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. *BMC Genetics*, 8(1), 18. doi:10.1186/1471-2156-8-18

- Huang, C.-C., Hsieh, Y.-C., Tsang, C.-L., & Chung, Y.-T. (2010). Sequence and phylogenetic analysis of the gp200 protein of *Ehrlichia canis* from dogs in Taiwan . *Journal of Veterinary Science*, *11*(4), 333. doi:10.4142/jvs.2010.11.4.333
- Hulinska, D., Votypka, J., Plch, J., Vlcek, E., Valesova, M., Bojar, M., Hulinsky, V. & Smetana, K.(2002). Molecular and microscopical evidence of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients, animals and ticks in the Czech Republic. *New Microbiol.* *25*(4), 437-448.
- Morar, D., Dărăbuș, G., Imre, M., Ilie, M. S., & Imre, K. (2015). First record of autochthonous canine ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* in Romania . *Veterinary Clinical Pathology*, *44*(2), 200–204. doi:10.1111/vcp.12252
- Inokuma, H., Ohno, K., & Yamamoto, S. (1999). Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *61*(10), 1153–1155. doi:10.1292/jvms.61.1153
- Iqbal, Z., Chaichana, S., & Rikihisa, Y. (1994). Comparison of PCR with other test for early diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*, 1658-1662.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 2761–2764. doi:10.1128/jcm.01228-07
- Jaramillo, G.P. (1996). Reporte de Ehrlichiosis canina en la ciudad de Montería, Departamento de Córdoba, Colombia. Documento proveniente de las memorias del

I congreso nacional y IV panamericano de Clínica y Cirugía de pequeñas especies.

VEPA.

Kaewmongkol, G., Manesaay, P., Suwanna, N., Tiraphut, B., Krajarngjang, T.,

Chouybumrung, A., & Fenwick, S. G. (2015). First Detection of *Ehrlichia canis* in Cerebrospinal Fluid From a Nonthrombocytopenic Dog with Meningoencephalitis By Broad-Range PCR . *J Vet Intern Med*, n/a–n/a. doi:10.1111/jvim.13788

Kamani, J., Lee, C.-C., Haruna, A. M., Chung, P.-J., Weka, P. R., & Chung, Y.-T. (2013).

First detection and molecular characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Nigeria. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 27–32. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.031

Kelly, P. J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., & Wang, C. (2013). Ehrlichiosis,

Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. *PLoS ONE*, 8(1), e53450. doi:10.1371/journal.pone.0053450

Kledmanee, K., Suwanpakdee, S., Krajangwong, S., Chatsiriwech, J., Suksai, P.,

Suwannachat, P., Sariya, L., Buddhirongawatr, R., Charoonrut, P., & Chaichoun, K. (2009). Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia spp* and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(1),35-39.

Kottadamane, M. R., Dhaliwal, P. S., Singla, L. D., & Sharma, A. (2015). Comparative

Molecular and Serological Diagnosis of Canine Monocytic Ehrlichiosis caused by

Ehrlichia canis in Ludhiana District of Punjab. *Veterinary and Animal Sciences*

University, Department of Veterinary Parasitology. India

Kommenou, A. A., Mylonakis, M. E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., &

Ofri, R. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis

(*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*, *10*(3),

137–142. doi:10.1111/j.1463-5224.2007.00508.x

Kongklieng, A., Thanchomnang, T., Intapan, P. M., Boonmars, T., Janwan, P., Sanpool, O.,

Lulitanond, V., Chungpivat, S., Morakote, N., & Maleewong, W. (2014). Detection of

Ehrlichia canis in canine blood samples by real-time fluorescence resonance energy

transfer (FRET) PCR and melting curve analysis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public*

Health *45*(5), 1149-1156.

Labruna, M. B., McBride, J. W., Camargo, L. M. A., Aguiar, D. M., Yabsley, M. J., Davidson,

W. R., & Walker, D. H. (2007). A preliminary investigation of Ehrlichia species in

ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology*, *143*(2), 189–

195. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.005

Lara, V., Aranciba, D., Saenz, M., & Bonilla, J. (2010). Hallazgo de Ehrlichiosis canina

Causada por *E. canis* en una comunidad del municipio de León. *Redvet*. ISSN 1695-

7504 11-03 (Electronic).

- Li, Y., Luo, J., & Yin, H. (2014). Molecular survey of Anaplasma and Ehrlichia in cervidae from northwestern. Chinese by PCR. *Tick and Tickborne Diseases, Lanzhou Veterinary Research Institute, China.*
- Liu, H. J. (2005). Molecular Identification of the Causative Agents of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma Phagocytophilum* in Dogs in Taiwan by Nested PCR, indirect immunofluorescent-antibody assay, and Sequence Analysis of the 16S rRNA Gene. *Department of Veterinary Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan*
- López, J., Castillo, A., Muñoz, M., & Hildebrandt, S. (1999). Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. *Arch. Med. Vet.*, 31(2). doi:10.4067/s0301-732x1999000200008
- Luque, J., & Herráez, A., (2006). Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Elsevier (Eds)
- Macieira, D. de B., Messick, J. B., Cerqueira, A. de M. F., Freire, I. M. A., Linhares, G. F. C., Almeida, N. K. de O., & Almosny, N. R. P. (2005). Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(1), 44–48. doi:10.1111/j.1939-165x.2005.tb00008.x`
- Mafra, C., Mazioli, R., Mantovani, C., Carrizo, J., Silva, I. & Soares, A. (2013). Occurrence of *Ehrlichia canis* in free-living primates of the genus *Callithrix*. *Biochemistry and Molecular Biology, Vicosa Federal University, Brazil.*

- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M., Cristóvão, J., Ramos, C., & Campino, L. (2015). Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasit Vectors*, 8(1), 138. doi:10.1186/s13071-015-0759-8
- Martin, C. L. (1990) Ocular infections. En: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Saunders (Eds.), (pp. 209). Philadelphia.
- Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., & Kyrpides, N. C. (2006). The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4015–4023. doi:10.1128/jb.01837-05
- McBride, J. W. (2002). Identification and Functional Analysis of an Immunoreactive DsbA-Like Thio-Disulfide Oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. *Infection and Immunity*, 70(5), 2700–2703. doi:10.1128/iai.70.5.2700-2703.2002
- McBride, J. W., Corstvet, R. E., Gaunt, S. D., Chinsangaram, J., Akita, G. Y., & Osburn, B. I. (1996). PCR Detection of acute *ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(4), 441–447. doi:10.1177/104063879600800406
- Messick, J.B., & Rikihisa, Y. (1994). Inhibition of binding entry, or intracellular proliferation of *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells by anti-*E.risticii* serum, Immunoglobulin G, or fab fragment. *Infection and immunity*, 62, 3156-61.

- Meyer, J., & Harvey, J. (2007). *Medicina Laboratorial Veterinaria Interpretación y Diagnosis*. (Ed.) Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Mihoubi, I., Monbrison, F., Romeuf, N., & Moulahem, T. (2006). Outsourced real-time PCR diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the outbreak region of Constantine, Algeria. *Algeria. Medicina Tropical*, 66, 39–44
- Mittal, M., Kundu, K., & Churamani, C. P. (2013). Molecular characterization of 16S ribosomal gene sequence of *Ehrlichia canis* from India. *Biotechnology Section, Central Military Veterinary Laboratory (CMVL)*, India
- Moreira, S. M., Bastos, C. V., Araújo, R. B., Santos, M., & Passos, L. M. F. (2003). Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(2), 141–147.
doi:10.1590/s0102-09352003000200003
- Moreira, S. M., Machado, R., & Passos, L. F. (2005). Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciência Rural*, 35(4), 958–960.
doi:10.1590/s0103-84782005000400038
- Moro, P., Shah, J., Li, O., Gilman, R.H., Harris, N., & Moro, M. (2009). Short report: serologic evidence of Human Ehrlichiosis in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 242- 244.

- Muramatsu, Y., Ukegawa, S., El Hussein, A. R. M., Abdel Rahman, M. B., Abdel Gabbar, K. M. A., Chitambo, A. M., & Tamura, Y. (2005). *Ehrlichia ruminantium*, Sudan. *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), 1792–1793. doi:10.3201/eid1111.050744
- Muñoz, L.E. & Casanueva. M. (2001). Ampliación de ámbito de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Chile. *Revista de Biología Tropical*, 49, 1285-1285.
- Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I., Leontides, L., Bourtzi-Hatzopoutou, E., Kontos, V.I., & Koutinas, A.F. (2009). Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of Canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary microbiology*, 138, 390-3. doi: 10.1016/J.vetmic.2009.04.015.
- Nakaghi, A. C. H., Machado, R. Z., Costa, M. T., André, M. R., & Baldani, C. D. (2008). Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*, 38(3), 766–770. doi:10.1590/s0103-84782008000300027
- Navarrete, M. G., Silva, C. B., Pires, M. S., Massard, C. L., Fonseca, A. H., Cordeiro, M. D., & Santos, H.A. (2015). Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Cuba. *Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil*
- NCBI Resource Coordinators. (2013). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 41, (Database issue): D8-D20. doi: 10.1093/nar/gks 1189.
- Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Greene, R. T., & Lappin, M. R. (2002). Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study

Group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(3), 309–315.

doi:10.1111/j.1939-1676.2002.tb02374.x

Nishio, T., Tateno, M., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Shimokawa Miyama, T., Setoguchi, A. & Endo, Y. (2012). Molecular epidemiological survey of Bartonella, Ehrlichia and Anaplasma infections in two Japanese wildcats, Iriomote cats (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*) and Tsushima leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). *Endo Kagoshima University, Laboratory of Small Animal Internal Medicine, Joint Faculty of Veterinary Medicine; I*, 21-24. Japan

Nyindo, M., Huxsoll, D. L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J. L., Carson, C. A., & Stephenson, E. H. (1980). Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 250–254.

Park, J., & Rikihisa, Y. (1991). Inhibition of *Ehrlichia risticii* infection in murine peritoneal macrophages by gamma interferon, a calcium ionophore, and concanavalin A. *Infection and Immunity*, 59, 3418–3423.

Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller (2007) *Microbiología Médica*. (Ed.) Elsevier.5:457

Passos, F., & Andereg, P.A. (1999). Ehrlichiosis canina. *CIBAGRO*, 16, 226-238.

- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human Infection with *Ehrlichia canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 110–117. doi:10.1196/annals.1374.016
- Perez, M., Rikihisa, Y., & Wen, B (1996) *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2133–2139.
- Piedrahita, D. (2012). Caracterización de ectoparásitos y hemoparásitos en una población de caninos de áreas rurales del Piedemonte Casanareño. Programa de Medicina Veterinaria. Universidad de La Salle. Tesis (Pregrado).
- Pinyoowong, D., Jittapalapong, S., Suksawat, F., Stich, R. W., & Thamchaipenet, A. (2008). Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(4), 433–438. doi:10.1016/j.meegid.2007.06.002
- Pusterla, N & Huder, J. (1999). Quantitative Real-Time PCR for Detection of Members of the *Ehrlichia phagocytophila* Genogroup in Host Animals and Ixodes ricinus Ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1329–1331.
- Ramos, C., and Araujo, F. R. (2010). *Ehrlichia canis* in a domestic cat in Brazil. *Sanidade Animal, Embrapa, Brazil*.

- Rikihisa, Y., Ewing, S. A., Fox, J. C., Gani, A., Pasaribu, F., & Malole, M. B. (1992). Analyses of *Ehrlichia canis* and a Canine Granulocytic Ehrlichia Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (1), 143-148.
- Ristic, M., Huxsoll, DL., Tachibana, N., & Rapmund, G. (1981). Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(6), 1324-1328.
- Ríos, A., Zapata, R., Reyes, J., Mejía, J., & Baena, A. (2010). Enzootic Stability of Bovine Babesiosis at Puerto Berrio Region, Colombia. *Rev. cient. (Maracaibo)*, 20 (5).
doi:10.1590/S0100-736X2014000400002
- Rodríguez-Mallon, A., Bechara, G. H., Zacarias, R. M., Benavides-Ortiz, E., Soto-Rivas, J. L., Gómez-Ramírez, A. P., & Estrada-García, M. P. (2013). Inhibition of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* transmission among ticks fed together on dogs vaccinated with Bm86 antigen. *Open Journal of Animal Sciences*, 03(03), 24–32.
doi:10.4236/ojas.2013.33a004
- Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M., & Harrus, S. (2012). Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 31(1), 226–233. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.003
- Rufino, C. P., Moraes, P. H. G., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D. C. F., McCulloch, J. A., & Gonçalves, E. C. (2013). Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA

Using Multiplex PCR . *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(12), 846–850.

doi:10.1089/vbz.2013.1303

Santamaria, A., Calzada, J. E., Saldaña, A., Yabsley, M. J., & Gottdenker, N. L. (2014).

Molecular Diagnosis and Species Identification of Ehrlichia and Anaplasma Infections in Dogs from Panama, Central America . *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(5), 368–370. doi:10.1089/vbz.2013.1488

Salazar, H., Buriticá, E., Echeverry, E., & Barbosa, I. (2014). 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). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 7(1), 56-63.

Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74–80. doi:10.1016/s1471-4922(00)01856-0

Silva-Molano, R.F., Sánchez-Ucrós, N., & Loaiza-Echeverri, A.M. (2008). Reporte de presentación de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. *Veterinaria y Zootecnia* 2(1), 27-31.

Silva, R., Sánchez, N., & Loaiza, A. (2008). Reporte de presentación de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2(1): 27-31.

- Silva, L. S., de Pinho, F. A., Pires, L. V., Braga, J. F. V., de Sousa, A. F., Cruz, M., Souza, F., Araujo, J. P. Jr., & Silva, S. (2012). *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in semiarid region of Brazil. *Clinica e Cirurgia Veterinaria, Universidade Federal do Piaui, Centro de Ciencias Agrarias, Brazil*.
- Sirigireddy, K. R., Mock, D. C., & Ganta, R. R. (2006). 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, 1078*(1), 552–556. doi:10.1196/annals.1374.108
- Skotarczak, B. (2003). Canine ehrlichiosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 10* (2), 137-41. doi: 10.1128/AAC.00358-07
- Sosa-Gutierrez, C .G., Quintero-Martinez, T., Torres, J., & Gordillo-Perez, G. (2015) First molecular and phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks in Mexico. *Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico*
- Stich, R. W., Rikihisa, Y., Ewing, S. A., Needham, G. R., Grover, D. L., & Jittapalapong, S. (2002). Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally Infected Ticks with a p30-Based PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology, 40*(2), 540–546. doi:10.1128/jcm.40.2.540-546.2002
- Stiles, J. (2000). Canine Rickettsial Infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 30*(5), 1135–1149. doi:10.1016/s0195-5616(00)05011-7

- Tamí, I. del C. de, & Tamí-Maury, I. M. (2004). Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 16(5), 345–349.
doi:10.1590/s1020-49892004001100008
- Tamamotoa, C., Seinoa, N., Suzukib, M., Kajic, K., Takahashid, H., & Inokumaa, H. (2007). Detection of *Ehrlichia muris* DNA from sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan. *Veterinary Parasitology*, 150 (4), 370–373.
doi:10.1016/j.vetpar.2007.09.017
- Tizard, I. (1996). Veterinary immunology. *Saunders (Ed.) Philadelphia*, (pp. 426–439).
- Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2001). Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2788–2793.
doi:10.1128/jcm.39.8.2788-2793.2001
- Unver, A., Rikihisa, Y., Kawahara, M., & Yamamoto, S. (2003). Analysis of 16S rRNA Gene Sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* Species from Canine Blood in Japan. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 692–698.
doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07445.x
- Unver, A., Rikihisa, Y., Borku, K., Ozkanlar, Y. E., & Hanedan, B. (2004). Characterization of *Ehrlichia canis* from a dog in Turkey. *Veterinary Biosciences, The Ohio State University*. USA.

- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 254–260. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.011
- Vieira, R. F. da C., Biondo, A. W., Guimarães, A. M. S., Santos, A. P. dos, Santos, R. P. dos, Dutra, L. H., & Vidotto, O. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(1), 01–12. doi:10.1590/s1984-29612011000100002
- Waner, T., & Harrus, S. (1997). Canine Monocytic ehrlichiosis En: *Recent advances in canine diseases infectious*. (Ed.) Carmichael. New York. (pp.236-247).
- 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, 307-17.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., & Cornelissen, A. W. C. (2001). 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*, 95(1), 1–15. doi:10.1016/s0304-4017(00)00407-6
- Waner, T., Strenger, C., & Keysary, A. (2000). Comparison of a Clinic-Based ELISA Test Kit with the Immunofluorescence Test for the Assay of *Ehrlichia canis* Antibodies in Dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(3), 240–244. doi:10.1177/104063870001200307

- Weisiger, R., Ristic, M., Huxsoll, L. (1975). Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 689–694.
- Wells, M., & Rikihisa, Y. (1988). Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P 388 D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infection and Immunity*, 56, 3209–3215.
- Wen, B., Jian, R., Zhang, Y., & Chen, R. (2002). Simultaneous Detection of *Anaplasma marginale* and a New Ehrlichia Species Closely Related to *Ehrlichia chaffeensis* by Sequence Analyses of 16S Ribosomal DNA in *Boophilus microplus* Ticks from Tibet. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3286–3290. doi:10.1128/jcm.40.9.3286-3290.2002
- Yabsley, M. J. (2010). Natural History of *Ehrlichia chaffeensis*: Vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 136–148.
doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.015
- Yamaguchi, R., Oda, M., Rungsipipat, A., Lan, N.T. & Uchida, K. (2006). Pathological study and detection of *Ehrlichia canis* in tissue by Nested PCR in experimental canine monocytic Ehrlichiosis. *Vet. Pathology*; 1(1), 889-2192, Japan.
- Zhang, X., Luo, T., Keysary, A., Baneth, G., Miyashiro, S., Strenger, C., & McBride, J. W. (2008). Genetic and Antigenic Diversities of Major Immunoreactive Proteins in

Globally Distributed *Ehrlichia canis* Strains. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(7), 1080–1088. doi:10.1128/cvi.00482-07

Zweygarth, E., Cabezas-Cruz, A., Josemans, A. I., Oosthuizen, M. C., Matjila, P. T., Lis, K., & Passos, L. M. F. (2014). In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), 423–431. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.011

Anexo 1. Formato de historia clínica utilizado en el estudio:

HISTORIA CLÍNICA (Tesis) REGISTRO_____

FECHA_____

NOMBRE_____ RAZA_____ SEXO_____ EDAD_____

PROPIETARIO_____ DIRECCIÓN_____

TEL_____ CLÍNICA_____

1. Motivo de Consulta_____

2. Anamnesis

3. Alimentación_____ Consumo_____

4. Vacunación_____ Desparasitación_____

5. SIGNOS CLÍNICOS: FC_____ PULSO_____ FR_____ T°_____

Patrón respiratorio:_____ E.G_____ C.C_____ Peso_____

6. VALORACIÓN SISTÉMICA:_____

7. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Muc. P. LL. C. L. P. Pon. Epistaxis Linfad. Petequias Uveit.

8. PLAN DX.

HTO. R.G.R C.M.H.C V.C.M R.G.B Diferencial R.P

9. FROTIS (tinción Wright):

Anexo 2. Secuencias parciales de *Ehrlichia canis*

| Descripción | Configuración | Identificación en GeneBank | Referencia |
|---|-------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 403 bp ADN lineal | Accession: AB287435.1 GI: 256353444 | Yamaguchi et al., 2006 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: ID64BJ18ALG407 | 300 bp ADN lineal | Accession: LC018188.1 GI: 820687593 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: ID64BJ17ALG408 | 292 bp ADN lineal | Accession: LC018187.1 GI: 820687592 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: ID64BJ15ALG317 | 292 bp ADN lineal | Accession: LC018186.1 GI: 820687591 | Maia et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: ID64BJ13ALG40 | 293 bp ADN lineal | Accession: LC018185.1 GI: 820687590 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: ID64BJ21ALG154 | 300 bp ADN lineal | Accession: LC018184.1 GI: 820687589 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento VTE gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 651 bp ADN lineal | Accession: AF373615.1 GI: 15150131 | Unver et al, 2001 |

| | | | |
|--|---------------------|--|--------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento VDE gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,408 bp ADN lineal | Accession: AF373613.1 GI: 15150129 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento VHE gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,408 bp ADN lineal | Accession: AF373612.1 GI: 15150128 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Kiwi 1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 680 bp ADN lineal | Accession: HQ844983.1 GI: 317383211 | Das et al., 2011 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Nero gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,386 bp ADN lineal | Accession: EU439944.1 GI: 168495546 | Diniz et al., 2008 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWF54 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228514.1 GI: 77999673 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWF1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228513.1 GI: 77999672 | Lui et al., 2005 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW17209 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228512.1 GI: 77999671 | |

| | | |
|--|-------------------|--|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW17146 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228511.1 GI: 77999670 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW17134 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228510.1 GI: 77999669 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW17124 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228509.1 GI: 77999668 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW17123 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 495 bp ADN lineal | Accession: DQ228508.1 GI: 77999667 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW17122 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 494 bp ADN lineal | Accession: DQ228507.1 GI: 77999666 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16983 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228506.1 GI: 77999665 |

| | | |
|--|-------------------|--|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16977 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228505.1 GI: 77999664 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16949 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228504.1 GI: 77999663 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16945 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228503.1 GI: 77999662 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16934 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 495 bp ADN lineal | Accession: DQ228502.1 GI: 77999661 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16927 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228501.1 GI: 77999660 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16924 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228500.1 GI: 77999659 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16659 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228499.1 GI: 77999658 |

| | | | |
|--|---------------------|-------------------------------------|---------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16611 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228498.1 GI: 77999657 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW16113 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 495 bp ADN lineal | Accession: DQ228497.1 GI: 77999656 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TW1216 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 496 bp ADN lineal | Accession: DQ228496.1 GI: 77999655 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Kagoshima 1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,387 bp ADN lineal | Accession: AF536827.1 GI: 33331025 | Univer et al., 2002 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-10/2013/Kylie gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 357 bp ADN lineal | Accession: KP662546.1 GI: 829088726 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-09/2014/Robin gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 354 bp ADN lineal | Accession: KP662545.1 GI: 829088725 | Mittal et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-08/2012/Gagan gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 351 bp ADN lineal | Accession: KP662544.1 GI: 829088724 | |

| | | | |
|---|-------------------|--|------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-07/2012/Bagga gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 349 bp ADN lineal | Accession: KP662543.1 GI: 829088723 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-06/2013/Chopin gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 356 bp ADN lineal | Accession: KP662542.1 GI: 829088722 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-05/2013/George gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 349 bp ADN lineal | Accession: KF888022.1 GI: 584614696 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-03/2013/Cheery gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 354 bp ADN lineal | Accession: KF888021.1 GI: 584614695 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-06/2013/Brandy gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 359 bp ADN lineal | Accession: KF888020.1 GI: 584614694 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CMVL-02/2013/Kiki gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 348 bp ADN lineal | Accession: KF888019.1 GI: 584614693 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 357 bp ADN lineal | Accession: KF878949.1 GI: 584297540 | Mittal et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento sample5 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 291 bp ADN lineal | Accession: KR816808.1 GI: 942429779 | Navarrete et al., 2015 |

| | | | |
|---|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Sample3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 280 bp ADN lineal | Accession: KR816807.1 GI: 942429778 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Sample4 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 282 bp ADN lineal | Accession: KR816806.1 GI: 942429777 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Sample1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 294 bp ADN lineal | Accession: KR816805.1 GI: 942429776 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial cepa: GADVASU | 362 bp ADN lineal | Accession: LC057655.1 GI: 827883384 | Kottadamane et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 75p gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 490 bp ADN lineal | Accession: KP844662.1 GI: 807531376 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 56p gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 490 bp ADN lineal | Accession: KP844661.1 GI: 807531375 | Sosa-Gutierrez et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 31p gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 476 bp ADN lineal | Accession: KP844660.1 GI: 807531374 | |

| | | | |
|--|-------------------|--|----------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 18g gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 480 bp ADN lineal | Accession: KP844659.1 GI: 807531373 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 32g gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 476 bp ADN lineal | Accession: KP844658.1 GI: 807531372 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 6g gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 490 bp ADN lineal | Accession: KP844657.1 GI: 807531371 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 07b-UE08 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 303 bp ADN lineal | Accession: KP717552.1 GI: 778091146 | Cardoso et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento YY gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 347 bp ADN lineal | Accession: KP182950.1 GI: 752900494 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento UU gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 347 bp ADN lineal | Accession: KP182949.1 GI: 752900493 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento T gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 349 bp ADN lineal | Accession: KP182948.1 GI: 752900492 | Adao et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento LLL gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 346 bp ADN lineal | Accession: KP182947.1 GI: 752900491 | |

| | | | |
|---|----------------------|---|--------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento HHH gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 346 bp ADN lineal | Accession: KP182942.1 GI: 752900486 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento EEE gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 347 bp ADN lineal | Accession: KP182941.1 GI: 752900485 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 674 bp ADN lineal | Accession: KM879929.1 GI: 751372677 | Kaewmongkol et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Oklahoma gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,433 bp rRNA lineal | Accession: NR_118741.1 GI: 645321869 | Anderson, et al., 1991 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-8 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 355 bp ADN lineal | Accession: KJ459920.1 GI: 657173965 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-7 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 402 bp ADN lineal | Accession: KJ459919.1 GI: 657173964 | Kongklieng et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-6 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KJ459918.1 GI: 657173963 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-5 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 383 bp ADN lineal | Accession: KJ459917.1 GI: 657173962 | |

| | | |
|---|-------------------|--|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-4 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 371 bp ADN lineal | Accession: KJ459916.1 GI: 657173961 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 308 bp ADN lineal | Accession: KJ459915.1 GI: 657173960 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 385 bp ADN lineal | Accession: KJ459914.1 GI: 657173959 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BK-1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 387 bp ADN lineal | Accession: KJ459913.1 GI: 657173958 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 81M gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KJ995844.1 GI: 678170686 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 47M gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KJ995843.1 GI: 678170685 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 79C gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: KJ995842.1 GI: 678170684 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 49CM gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 395 bp ADN lineal | Accession: KJ995841.1 GI: 678170683 |

Ferreira et al., 2014

| | | |
|---|-------------------|--|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 38CM gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KJ995840.1 GI: 678170682 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 20CM gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 357 bp ADN lineal | Accession: KJ995838.1 GI: 678170680 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 56C gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KJ995837.1 GI: 678170679 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 17CM gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 354 bp ADN lineal | Accession: KJ995836.1 GI: 678170678 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 70C gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 394 bp ADN lineal | Accession: KJ995835.1 GI: 678170677 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 38C gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 394 bp ADN lineal | Accession: KJ995834.1 GI: 678170676 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 66M gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 391 bp ADN lineal | Accession: KJ995833.1 GI: 678170675 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 97M gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 340 bp ADN lineal | Accession: KJ995832.1 GI: 678170674 |

| | | | |
|--|---------------------|--|-------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 71C gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KJ995831.1 GI: 678170673 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 17C gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: KJ995830.1 GI: 678170672 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento S3b gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,423 bp ADN lineal | Accession: KJ659037.1 GI: 659676639 | Li et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Ec_1335 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 364 bp ADN lineal | Accession: KF360840.1 GI: 530540016 | Santamaria et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Ec_1605 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 364 bp ADN lineal | Accession: KF360839.1 GI: 530540015 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Belem Ec01 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 478 bp ADN lineal | Accession: KC109445.1 GI: 482721601 | Rufino et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 222 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,372 bp ADN lineal | Accession: KC479024.1 GI: 523584548 | Zweygarth et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 171 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,372 bp ADN lineal | Accession: KC479023.1 GI: | |

| | | | |
|--|---------------------|-------------------------------------|---------------------|
| | | 523584547 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento UFV1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 341 bp ADN lineal | Accession: KC822950.1 GI: 507117208 | Mafra et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 165984 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 318 bp ADN lineal | Accession: JX261981.1 GI: 402810449 | Eiras et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 160138 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 318 bp ADN lineal | Accession: JX261980.1 GI: 402810448 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone FVM-TM/RO gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 410 bp ADN lineal | Accession: KC305491.1 GI: 443611671 | Morar, et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: CMM-19 (2006) | 1,369 bp ADN lineal | Accession: AB723712.1 GI: 440647122 | Nishio et al., 2012 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: W-137J | 1,369 bp ADN lineal | Accession: AB723710.1 GI: 440647120 | |

| | | | |
|--|------------------------|---|-----------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: E-60 | 1,369 bp ADN lineal | Accession: AB723709.1 GI: 440647119 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: W-134 | 1,369 bp ADN lineal | Accession: AB723708.1 GI: 440647118 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial aislamiento: E-89J | 1,369 bp ADN lineal | Accession: AB723707.1 GI: 440647117 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento LSSEC-1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: JX437966.1 GI: 406353199 | Silva et al., 2012 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa NGR clone 94 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,623 bp ADN lineal | Accession: JN982339.1 GI: 398330191 | Chung et al., 2011 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa NGR clone 80 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,623 bp ADN lineal | Accession: JN982336.1 GI: 398330186 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 944 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 391 bp ADN lineal | Accession: JX392985.1 GI: 402746912 | Ferreira et al., 2012 |

| | | | |
|---|---------------------|---|--------------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa NGR clone 64 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,623 bp ADN lineal | Accession: JN622141.1 GI: 398330181 | Kamani et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone 1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 362 bp ADN lineal | Accession: JN368080.1 GI: 359801423 | Vargas- Hernandez et al., 2012 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa TWN gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,620 bp ADN lineal | Accession: GU810149.1 GI: 294715517 | Huang et al., 2010 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa UFV6 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 391 bp ADN lineal | Accession: EU567025.1 GI: 189418701 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa UFV5 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: EU567024.1 GI: 189418700 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa UFV4 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 277 bp ADN lineal | Accession: EU567023.1 GI: 189418699 | De Oliveira et al., 2009 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa UFV3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 277 bp ADN lineal | Accession: EU567022.1 GI: 189418698 | |

| | | | |
|---|---------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa UFV1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 277 bp ADN lineal | Accession: EU567020.1 GI: 189418696 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> biotype Beskydy gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 298 bp ADN lineal | Accession: EF417993.1 GI: 134285209 | Hulinska et al., 2002 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento EC1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: EF424612.1 GI: 126256514 | Hori-Oshima et al., 2007 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa FC-CG gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 383 bp ADN lineal | Accession: GU991633.1 GI: 295243908 | Ramos et al., 2010 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa PoAnE1dt gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 334 bp ADN lineal | Accession: EF051166.1 GI: 120431233 | Alexandre et al., 2009 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,433 bp ADN lineal | Accession: M73226.1 GI: 148299 | Anderson et al., 1991 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,433 bp ADN lineal | Accession: M73221.1 GI: 148294 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,481 bp ADN lineal | Accession: EF139458.1 GI: 119496972 | Pinyoowong et al., 2008 |

| | | | |
|---|---------------------|-------------------------------------|----------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Kutahya gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,410 bp ADN lineal | Accession: AY621071.1 GI: 53680548 | Unver et al., 2004 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,318 bp ADN lineal | Accession: DQ915970.1 GI: 115344227 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Sao Paulo gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 339 bp ADN lineal | Accession: DQ460714.1 GI: 93115968 | Aguiar et al., 2006 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 347 bp ADN lineal | Accession: DQ648491.1 GI: 109706809 | Desai et al., 2006 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,412 bp ADN lineal | Accession: AY394465.1 GI: 37620359 | Aguirre et al., 2004 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 358 bp ADN lineal | Accession: AF308455.1 GI: 11066971 | Suto et al., 2001 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Gxht67 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 967 bp ADN lineal | Accession: AF156786.1 GI: 5070711 | Pan et al., 1999 |

| | | | |
|--|---------------------|--|-----------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Gdt3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 967 bp ADN lineal | Accession: AF156785.1 GI: 5070710 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento T11 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 210 bp ADN lineal | Accession: KP719094.1 GI: 902543174 | Xu et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento D640 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 210 bp ADN lineal | Accession: KP719093.1 GI: 902543171 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento ECSA gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 364 bp ADN lineal | Accession: KJ095115.1 GI: 662008859 | Lorusso et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 92g gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 460 bp ADN lineal | Accession: KP844663.1 GI: 807531377 | Sosa-Gutierrez et al., 2015 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 306 bp ADN lineal | Accession: AB934388.1 GI: 641446296 | Nakayima et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento TrKysEcan3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,507 bp ADN lineal | Accession: KJ513197.1 GI: 632796217 | Inci et al., 2014 |

| | | | |
|--|---------------------|---|------------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento TrKysEcan2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,508 bp ADN lineal | Accession: KJ513196.1 GI: 632796216 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento TrKysEcan1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,513 bp ADN lineal | Accession: KJ513194.1 GI: 632796215 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial , note: sample:E1 | 296 bp ADN lineal | Accession: AB896787.1 GI: 612134873 | Maia et al.,2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bctick7 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: KF972452.1 GI: 589437331 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bcdog2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: KF972451.1 GI: 589437295 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bctick5 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 395 bp ADN lineal | Accession: KF972450.1 GI: 589437246 | Goncalves et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bctick1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 390 bp ADN lineal | Accession: KF972449.1 GI: 589437218 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bctick3 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: KF972448.1 GI: 589437211 | |

| | | | |
|---|-------------------|---|-----------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bctick2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 396 bp ADN lineal | Accession: KF972447.1 GI: 589437181 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone Bcdog1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 392 bp ADN lineal | Accession: KF972446.1 GI: 589437149 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Hv2 16S ribosomal RNA gene partial sequence | 320 bp ADN lineal | Accession: KF034789.1 GI: 534289317 | Aktas et al., 2014 |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone 5682 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 335 bp ADN lineal | Accession: KF536738.1 GI: 534310844 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone 4459 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 339 bp ADN lineal | Accession: KF536737.1 GI: 534310843 | Karthika et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone 2745 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 324 bp ADN lineal | Accession: KF536734.1 GI: 534310840 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento CA08 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 380 bp ADN lineal | Accession: KC989958.1 GI: 531064710 | Sousa et al., 2013 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT19A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976665.1 GI: 387941727 | Kamani et al., 2013 |

| | | |
|---|------------------|--|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 713A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976664.1 GI: 387941726 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT9 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976663.1 GI: 387941725 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT20 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976662.1 GI: 387941724 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT12 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976661.1 GI: 387941723 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT16N gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 89 bp ADN lineal | Accession: JQ976660.1 GI: 387941722 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT27A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976659.1 GI: 387941721 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT23A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976658.1 GI: 387941720 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT24N gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976657.1 GI: 387941719 |

| | | |
|---|------------------|--|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT02A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 93 bp ADN lineal | Accession: JQ976656.1 GI: 387941718 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT13A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976655.1 GI: 387941717 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento DT18A gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976654.1 GI: 387941716 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento J33 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976641.1 GI: 387941703 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento ZA09 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976640.1 GI: 387941702 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento PH10 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976639.1 GI: 387941701 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento ZA01 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976638.1 GI: 387941700 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento ZA04 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976637.1 GI: 387941699 |

| | | | |
|--|-------------------|--|---------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento PH12 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 89 bp ADN lineal | Accession: JQ976636.1 GI: 387941698 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento J23 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976635.1 GI: 387941697 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 1234 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976634.1 GI: 387941696 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento J25 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976633.1 GI: 387941695 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento J02 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 93 bp ADN lineal | Accession: JQ976632.1 GI: 387941694 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento 736 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 96 bp ADN lineal | Accession: JQ976631.1 GI: 387941693 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento ZA03 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 95 bp ADN lineal | Accession: JQ976630.1 GI: 387941692 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa SK-147 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 362 bp ADN lineal | Accession: JX112782.1 GI: 455658038 | Loftis et al., 2013 |

| | | | |
|---|---------------------|---|--------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Bareilly gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,478 bp ADN lineal | Accession: JX861392.1 GI: 429460760 | Kundu et al., 2012 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Irani-2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 200 bp ADN lineal | Accession: JX556421.1 GI: 410517311 | Maazi et al., 2012 |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Irani-1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 203 bp ADN lineal | Accession: JX556420.1 GI: 410517310 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 10M540258 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718614.1 GI: 338808494 | Wong et al., 2011 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 10M540207 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718613.1 GI: 338808493 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 10M540188 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718612.1 GI: 338808492 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 10M540118 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718611.1 GI: 338808491 | |

Ehrlichia canis cepa 10M540098 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718610.1 GI: 338808490

Ehrlichia canis cepa 10M540042 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718609.1 GI: 338808489

Ehrlichia canis cepa 805B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718608.1 GI: 338808488

Ehrlichia canis cepa 786B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718607.1 GI: 338808487

Ehrlichia canis cepa 681B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718606.1 GI: 338808486

Ehrlichia canis cepa 669B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718605.1 GI: 338808485

Ehrlichia canis cepa 611B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial 316 bp ADN lineal Accession: HQ718604.1 GI: 338808484

| | | | |
|---|---------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 589B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718603.1 GI: 338808483 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 588B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718602.1 GI: 338808482 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa 580B gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 316 bp ADN lineal | Accession: HQ718601.1 GI: 338808481 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento Bareilly from dog gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 389 bp ADN lineal | Accession: JN967645.1 GI: 374251629 | Kumar et al., 2011 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Uberlandia gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 358 bp ADN lineal | Accession: JF728840.1 GI: 332650713 | Rieck et al ., 2011 |
| <i>Ehrlichia canis</i> gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 398 bp ADN lineal | Accession: DQ401044.1 GI: 89274869 | Dagnone et al., 2006 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Brazil-CO2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,434 bp ADN lineal | Accession: EF195135.1 GI: 123979214 | De Paiva et al., 2007 |

| | | |
|---|---------------------|---|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Brazil-CO1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 1,434 bp ADN lineal | Accession: EF195134.1 GI: 123979213 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa CNN20 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 419 bp ADN lineal | Accession: EU781695.1 GI: 208969244 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa CN22 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 419 bp ADN lineal | Accession: EU781694.1 GI: 208969243 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa CN21 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 419 bp ADN lineal | Accession: EU781693.1 GI: 208969242 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa CN20 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 419 bp ADN lineal | Accession: EU781692.1 GI: 208969241 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa CN17 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 419 bp ADN lineal | Accession: EU781691.1 GI: 208969240 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BD20 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 410 bp ADN lineal | Accession: EU781689.1 GI: 208969238 |

M`ghirbi et al., 2009

| | | | |
|---|-------------------|---|---------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BD17 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 407 bp ADN lineal | Accession: EU781688.1 GI: 208969237 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa BD15 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 400 bp ADN lineal | Accession: EU781687.1 GI: 208969236 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa CN1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 419 bp ADN lineal | Accession: EU781686.1 GI: 208969235 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa YNE-2 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 241 bp ADN lineal | Accession: DQ494537.1 GI: 94982579 | Zhang et al., 2006 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa YNE-1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 243 bp ADN lineal | Accession: DQ494536.1 GI: 94982578 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento GO 05 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 462 bp ADN lineal | Accession: GU386289.1 GI: 289472088 | Duarte et al., 2010 |

| | | | |
|--|-------------------|---|---------------------|
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento GO 04 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 463 bp ADN lineal | Accession: GU386288.1 GI: 289472087 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento GO 03 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 462 bp ADN lineal | Accession: GU386287.1 GI: 289472086 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento GO 02 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 461 bp ADN lineal | Accession: GU386286.1 GI: 289472085 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> aislamiento GO 01 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 462 bp ADN lineal | Accession: GU386285.1 GI: 289472084 | |
| <i>Ehrlichia canis</i> clone EC4389-875A Hira gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 387 bp ADN lineal | Accession: GU182114.1 GI: 270271196 | Kumar et al.,2009 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Hd48 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 575 bp ADN lineal | Accession: GQ395381.1 GI: 265264979 | Gotsch et al., 2009 |
| <i>Ehrlichia canis</i> cepa Hd38-1 gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 591 bp ADN lineal | Accession: GQ395380.1 GI: | <hr/> |

265264977

Ehrlichia canis cepa Hd22 gen 16S RNA ribosomal, secuencia
parcial

601 bp ADN
lineal

Accession:
GQ395378.1 GI:
265264975
