

Estudio Serológico y Molecular de *Ehrlichia canis* en Perros de una Comunidad del Estado Aragua, Venezuela

A SEROLOGICAL AND MOLECULAR SURVEY OF *Ehrlichia canis* IN DOGS FROM A COMMUNITY IN ARAGUA STATE, VENEZUELA

María del Carmen Martínez A.^{1,2,3}, Cruz María Arraga-Alvarado⁴, Francisco Javier Triana-Alonso^{1†}, Johanny Alejandra Ruiz C.^{1,2}, Clara Nancy Gutiérrez G.^{1,2,5,6}

RESUMEN

Los objetivos de esta investigación fueron determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*E. canis* y la detección molecular de *E. canis*, así como determinar el nivel de infestación y especies de garrapatas en perros de una comunidad rural del estado Aragua, Venezuela. Se recolectaron muestras sanguíneas de 110 perros domésticos y fueron evaluadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR). La seroprevalencia resultó en 77.3% y la detección molecular fue de 45.2%. El porcentaje de perros infestados por garrapatas fue de 69%, identificándose mayormente a *Rhipicephalus sanguineus*. Se determinó que 80% (68/85) de los perros seropositivos y el 32% (8/25) de los seronegativos estaban infestados por garrapatas (OR=8.5, IC 95%: 3.19-22.6; p<0.00001).

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, ehrlichiosis, IFI, PCR, *Rhipicephalus sanguineus*, Venezuela

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas «Dr. Francisco J. Triana-Alonso», Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), Venezuela

² Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas «Dr. Carlos Palacios», Departamento de Microbiología, ³ Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud-Sede Aragua, Universidad de Carabobo, Venezuela

⁴ Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Venezuela

⁵ E-mail: claranancy88@hotmail.com; claranancy@gmail.com

⁶ Financiamiento: Proyecto de Inversión Mayor CDCH-UC 96-014 y Proyecto de Inversión Menor CDCH-UC 335-07

Recibido: 9 de febrero de 2015

Aceptado para publicación: 15 de junio de 2015

ABSTRACT

The aims of the study were to determine the prevalence of antibodies anti-*E. canis* and the molecular detection of *E. canis* as well as to determine the species and level of tick infestations in dogs from a rural community in Aragua state, Venezuela. Blood samples from 110 domestic dogs were obtained and analyzed by Indirect Immunofluorescence (IFI) and Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). The seroprevalence was 77.3% and the molecular detection was 45.2%. The percentage of dogs infested with ticks was 69%, mostly with *Rhipicephalus sanguineus*. The results showed that 80% (68/85) of seropositive dogs and 32% (8/25) of seronegative dogs were tick infested (OR=8.5, 95%, CI 3.19 to 22.6; $p < 0.00001$).

Key words: *Ehrlichia canis*, ehrlichiosis, IFI, PCR, *Rhipicephalus sanguineus*, Venezuela

INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad importante, considerada emergente que afecta a los perros y otros cánidos, y cuyo agente etiológico es primordialmente *Ehrlichia canis* (Little, 2010; Neer *et al.*, 2002); sin embargo, hay reportes de ehrlichiosis canina causada por *E. chaffeensis* (Breitschwerdt *et al.*, 2014).

E. canis es una bacteria intracelular obligatoria, Gram negativa y pleomórfica que tiene tropismo por células mononucleares (Harrus y Waner, 2011), clasificada en la familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001). Se transmite principalmente por la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, de amplia distribución mundial (Groves *et al.*, 1975). La alta prevalencia de esta garrapata en las regiones tropicales y subtropicales es favorecida por las condiciones climáticas que le permiten mantenerse activas durante todo el año, determinando que en estas regiones también se observe una mayor prevalencia de *E. canis* en perros (Vieira *et al.*, 2011). *R. sanguineus* adquiere *E. canis* al alimentarse de perros infectados, pudiendo transmitir la infección por lo menos durante 155 días (Groves *et al.*, 1975).

La enfermedad se caracteriza por presentar tres etapas: aguda, subclínica y crónica. La etapa aguda se presenta entre 1 y 3 semanas después de la picadura de garrapatas infectadas. Los perros presentan fiebre, anorexia, pérdida de peso, conjuntivitis, descargas oculares y nasales, linfadenomegalia y esplenomegalia; así como anemia normocítica y normocrómica, leucopenia y trombocitopenia entre los hallazgos hematológicos. En la etapa subclínica hay persistencia del microorganismo en el huésped en ausencia de signos clínicos, pudiendo permanecer desde semanas a años, donde puede ocurrir anemia no regenerativa, leucopenia y trombocitopenia moderada. La hipoplasia de la médula ósea es un hallazgo característico de la fase crónica y puede resultar en pancitopenia marcada. Al igual que en la etapa aguda, hay tendencia a hemorragias, debido a la trombocitopenia y la trombopatía (Harrus *et al.*, 1999; Preziosi y Cohn, 2002; Procajlo *et al.*, 2011). En el perro es muy común la enfermedad asintomática, constituyendo un factor epidemiológico importante para la diseminación de la infección.

En Venezuela, *E. canis* se encontró por primera vez en Maracaibo, Zulia, en 1992 (Arraga, 1992); sin embargo, se dispone de

escasa información local, a diferencia de otros países donde se dispone de numerosas publicaciones sobre su seroprevalencia y detección molecular (Silva *et al.*, 2010; Nazari *et al.*, 2013; Rojas-Triviño *et al.*, 2013; Pérez-Vera *et al.*, 2014). La presente investigación reporta la prevalencia serológica y la detección molecular de *E. canis* y de otras posibles especies de la familia Anaplasmateaceae en la comunidad de Jobalito, municipio Ribas del estado Aragua, debido al reporte de casos de ehrlichiosis humana en esta zona. También informa sobre las especies de garrapatas encontradas en los perros infestados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área del Estudio

La comunidad de Jobalito está localizada en el municipio Ribas, estado Aragua, en el centro-norte de Venezuela, con características de bosque seco premontano. El clima es marcadamente estacional, con periodos de lluvia y sequía, esta última de noviembre a abril. El promedio de temperatura anual es de 25 °C (20-30 °C) y la precipitación pluvial es de 850 a 1000 mm.

Población y Muestras

En la comunidad habitaban 203 familias y un total de 210 perros. De estos, se analizaron las muestras de 110 canes entre marzo y septiembre de 2012. El número de perros por vivienda era de 0 a 5; sin embargo, solo se tomó una muestra por vivienda, de modo que en aquellas casas con más de un perro, se seleccionó uno al azar mediante un muestreo aleatorio simple.

De cada perro se obtuvieron dos muestras de sangre por punción de la vena cefálica. Una muestra en un tubo sin anticoagulante, la cual se centrifugó a 2500 g durante 5 min, y el suero resultante fue almacenado a -20 °C. La otra muestra se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA,

desde donde se distribuyó en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -70 °C. Asimismo, se recolectaron garrapatas por tracción ligera a contrapelo. Los especímenes fueron preservados en alcohol isopropílico al 70% para su posterior identificación con las claves de Jones *et al.* (1972) y Guerrero (1996).

Para la identificación por PCR de las especies *E. chaffeensis* y *E. canis*, se procesaron 31 muestras seleccionadas de manera aleatoria, lo cual representa el 28% de perros que participaron en el estudio.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La prueba de IFI fue realizada de acuerdo a lo reportado por Rikihisa *et al.* (1992). Los sueros fueron diluidos 1:40 en buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2). Se utilizaron láminas de 12 círculos con antígeno de *E. canis* (las células infectadas con *E. canis* fueron cedidas por Jacqueline Dawson, CDC de Atlanta). En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos, además de un control de PBS. Se consideraron positivas aquellas muestras en las que se observaban mórulas fluorescentes y negativas aquellas con ausencia de fluorescencia.

Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La extracción del ADN y el PCR se realizaron de acuerdo a técnicas descritas previamente utilizando kits comerciales (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Para la PCR de género se utilizó $1.75 \pm 0.84 \mu\text{g}$ (contenidos en $10 \mu\text{l}$) de las muestras de ADN. Cada muestra fue amplificada en un volumen de reacción de $50 \mu\text{l}$, el cual contenía 5 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l de una mezcla de dexoxinucleósidos trifosfato, 1.25 U de *Taq* polimerasa (Promega, Madison, WI, EEUU) y 2 pmol de los siguientes cebadores: ECB (5'-CGTATTACC GCGGCTGCTGGCA3') y ECC (5'-AGA-ACGAACGCTGGCGGCCAAGC-3').

Se inició con 94 °C durante 4 min y luego 40 ciclos de 94 °C durante 1 min para la desnaturalización, 68 °C por 1 min para la hibridación y 72 °C por 1 min para la extensión en un termociclador (PTC-200 MJ Research, GMI Inc., Ramsey, MN, EEUU). Para la PCR anidada, la mezcla de reacción y condiciones fueron las mismas que la anterior PCR, excepto por los cebadores, temperatura de hibridación y templete de ADN.

Para la amplificación de *E. canis* se utilizaron 2 pmol de los cebadores: «canis» (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') y HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3').

Para la amplificación de *E. chaffeensis* se utilizaron 2 pmol de los cebadores: HE1 (5'-CAATTGCTTATA-ACCTTTTGGTTATAAAT-3') y HE3.

La temperatura de hibridación fue de 60 °C por 1 min y 1 µl del producto de la primera amplificación se utilizó como molde de ADN. Como control positivo de ADN se emplearon purificados de células DH82 infectadas con *E. canis* y *E. chaffeensis*. Asimismo, se utilizó ADN purificado de cultivo *Escherichia coli* como control positivo para los cebadores ECB y ECC y como control de especificidad para el par de cebadores «canis»/HE3 y HE1/HE3. Como control negativo se utilizó ADN purificado de muestras sanguíneas obtenidas de cuatro cachorros recién nacidos sin contacto con garrapatas. Se incluyó un control negativo sin templete de ADN, usando agua en su lugar. Los productos de las reacciones de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1.2 %, se colorearon con bromuro de etidio y se fotografiaron con iluminación UV.

Análisis Estadístico

Para calcular la prevalencia de anticuerpos IgG anti-*E. canis* en perros, se asumió que existía una prevalencia de al menos 50%, por lo cual se requirió un tamaño

mínimo de muestra de 96 perros para una población total de 210 caninos, probabilidad de error tipo I de 0.05 y una potencia de 80%. El cálculo del tamaño de muestra se hizo a través del programa Epi Info (Fleis, 1981). Se calculó la seroprevalencia de anticuerpos anti-*E. canis* e identificación molecular utilizando la distribución de frecuencias y porcentajes.

Las variables perros seropositivos y tenencia de garrapatas se analizaron utilizando la razón de suertes (OR) cruda y la prueba de asociación estadística se hizo a través de la distribución Chi cuadrado. El nivel de significancia (α) para las pruebas estadísticas fue de 0.05. Para el análisis de los datos se utilizaron los paquetes estadísticos Epi Info v. 6.04c y Stata v. 5.0.

RESULTADOS

En el análisis serológico en busca de anticuerpos IgG anti-*E. canis*, se detectaron 85 muestras positivas (85/110; 77.3%) y 25 muestras negativas (25/110; 22.7%).

Se colectaron cerca de 500 garrapatas de 76 perros (76/110; 69%). Todas las garrapatas eran de cuerpo duro (Ixodidae) y la mayoría de la especie *R. sanguineus* (garrapata marrón del perro), tanto adultos (machos y hembras) como ninfas. Además, se identificaron dos ejemplares adultos (macho y hembra) de *Amblyomma cajennense*, un adulto (hembra) de *A. maculatum*, un adulto (hembra) de *Amblyomma* sp y una ninfa, probablemente, de *A. cajennense*.

El 80% (68/85) de los perros seropositivos y el 32% (8/25) de los seronegativos estaban infestados por garrapatas. El OR estimado fue de 8.5 (IC 95%; 3.19-22.6); es decir, los perros que tenían garrapatas tuvieron más probabilidad de ser seropositivos que los perros que no las tenían ($p < 0.00001$).

Cuadro 1. Frecuencia de *Ehrlichia canis* en perros provenientes de la comunidad de Jobalito, Zuata estado Aragua, mediante PCR anidada

Género (ECC/ECB)	<i>E. canis</i> (HE3/ECA)		Total	<i>E. chaffeensis</i> (HE3/HE1)	
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo
Negativo	11 (35.5)	4 (12.9)	15 (48.4)	15 (48.4)	0 (0.0)
Positivo	6 (19.3)	10 (32.3)	16 (51.6)	16 (51.6)	0 (0.0)
Total	17 (54.8)	14 (45.2)	31 (100)	31 (100)	0 (0.0)

Cuadro 2. Relación entre la serología a *E. canis* y resultados de la PCR anidada en perros de la comunidad de Jobalito. Parroquia Zuata, Estado Aragua

Serología	<i>E. canis</i> (HE3/ECA)		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	10 (32.2) ¹	0 (0.0)	10 (32.2)
Positivo	7 (22.6)	14 (45.2)	21 (67.8)
Total	17 (54.8)	14 (45.2)	31 (100)

¹ Los valores entre paréntesis son porcentuales

Al examinar las muestras de perros con la PCR de género (cebadores ECC/ECB), 51.6% (16/31) fueron positivas. La PCR anidada para *E. canis* (cebadores HE3/ECA) resultó positiva en 45.2% (14/31). Con respecto a los resultados de la PCR para *E. chaffeensis* (cebadores HE1/HE2) ninguna de las muestras resultó positiva (Cuadro 1). Es importante resaltar que 19.3 (6/31) y 51.6% (16/31) de las muestras fueron positivas a género y negativas a las especies *E. canis* y *E. chaffeensis*, respectivamente (Cuadro 1).

Con relación al resultado serológico, las 14 muestras PCR anidadas positivas fueron seropositivas y de las 17 muestras PCR anidadas negativas, 10 fueron seronegativas y 7 fueron seropositivas (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

En diversas publicaciones se evidencia la seroprevalencia y detección molecular de *E. canis*. En un estudio reciente se encontró 0.3% (10/340) de seropositividad para *E. canis* en Finlandia, utilizando Dot-ELISA SNAP 4DX® (Pérez-Vera *et al.*, 2014). Asimismo, Qurollo *et al.* (2014) reportaron una seropositividad de 1.8% en perros de Estados Unidos (n=6582), 3.2% en Canadá (n=285) y 27.6% en la región del Caribe (n=29), utilizando el ELISA SNAP, en tanto que se ha reportado una seropositividad de 7.1% en áreas rurales y urbanas de Italia utilizando el método de IFI (Ebani *et al.*, 2014).

En regiones tropicales como Brasil, se encontraron estudios con seropositividades

muy similares, de 42.4% (Vieira *et al.*, 2013) y 42.5% (Silva *et al.*, 2010). Recientemente, en Venezuela se realizó un estudio serológico en el caserío «La Isla», del estado Lara, encontrando una prevalencia del 46.2% utilizando la prueba de ELISA SNAP 4DX® (Almao *et al.*, 2013). El 77.3% de seroprevalencia del presente estudio fue mayor que el obtenido en estos estudios. Las diferencias encontradas entre la seroprevalencia de *E. canis* en países de climas más fríos o templados con los de zonas tropicales podrían deberse a la alta prevalencia de la garrapata *R. sanguineus* en estos últimos.

En trabajos de detección molecular de *E. canis*, Nazari *et al.* (2013) obtuvieron una prevalencia del 2% en perros de clínicas veterinarias y de refugios de Malasia. Esta baja prevalencia molecular en un país tropical, según los autores, pudo deberse a que la infección se encontraba en etapa subclínica o crónica o que las garrapatas de la zona no estaban lo suficientemente infectadas.

En un estudio en Brasil con 320 perros de áreas urbanas y rurales, se encontró una prevalencia molecular general del 15% (Santos *et al.*, 2013). Asimismo, Silva *et al.* (2010), trabajando con 472 perros en el noreste brasilero encontraron el 34.5% de los perros positivos. Es así que el 45.2% de perros positivos en el presente estudio fue superior a estos reportes. No obstante, Rojas-Triviño *et al.* (2013), trabajando en Colombia con perros abandonados, encontraron la más alta prevalencia revisada (92.8%) sobre esta investigación.

Las diferencias encontradas entre las muestras positivas a género y negativas a las especies de *E. canis* y *E. chaffeensis*, probablemente se deban a que los cebadores usados en la primera PCR de género (ECC/ECB) amplifican, además, a otras especies, lo que podría indicar infección por otras especies de *Ehrlichia* (*E. ewingii* u otras), otras especies de la familia Anaplasmataceae (*A. platys*, *A. phagocytophilum*) e incluso por *Rickettsia rickettsii*.

De las 17 muestras PCR anidadas negativas, 10 fueron seronegativas, lo que podría indicar que estos perros nunca estuvieron en contacto con *E. canis*, mientras que los siete perros seropositivos en algún momento fueron positivos, y posiblemente tratados y libres de la bacteria en el momento del muestreo. Asimismo, los resultados del presente estudio, tanto serológicos como de PCR, evidencian que la mayoría de los positivos son consecuencia de la infección a *E. canis*, pero existe la posibilidad de que otras especies de *Ehrlichia* pudieran estar presentes.

El 69% de infestación de perros por garrapatas encontrado en el presente estudio resultó alto en comparación con el 6.8% (32/472) en Brasil (Silva *et al.*, 2010) donde todas las garrapatas encontradas fueron *R. sanguineus*, y el 53% (278/525) obtenido por Abd Rani *et al.* (2011), donde, igualmente, la mayoría fue *Rhipicephalus* sp, seguido de especímenes del género *Haemaphysalis*. En Venezuela hay pocos estudios de garrapatas en perros diferentes a *R. sanguineus*; sin embargo, en el estado Aragua se identificaron dos especies del género *Amblyoma*: *A. maculatum*, especie también identificada en la presente investigación y *A. parvum* (Manzanilla *et al.*, 2002).

Los resultados presentados en esta investigación son aportes de gran importancia para Venezuela. No obstante, se hace necesario seguir indagando acerca del papel del perro como potencial reservorio de *E. chaffeensis*, ya que existen reportes de esta especie en caninos (Gutiérrez *et al.*, 2009; Breitschwerdt *et al.*, 2014) y humanos (Martínez *et al.*, 2008). Además, los perros son frecuentemente infectados por *A. platys*, una bacteria intraplaquetaria que causa trombocitopenia cíclica en los caninos (Harvey *et al.*, 1978) y se ha demostrado recientemente, mediante pruebas moleculares, la presencia de esta bacteria en sangre humana en EEUU (Maggi *et al.*, 2013, Breitschwerdt *et al.*, 2014) y en Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

- En la comunidad de Jobalito del municipio Ribas (estado Aragua) existe una elevada prevalencia de anticuerpos anti-*E.canis* (77.3%) en perros domésticos, siendo la detección molecular de 45.2%.
- El 69% de los perros se encuentra infestado por garrapatas, mayormente *Rhipicephalus sanguineus*.
- Se encontró una asociación significativa entre la presencia de garrapatas en los perros y la serorreactividad a *E. canis*.

LITERATURA CITADA

1. **Abd Rani PAI, Irwin PJ, Coleman GT, Gatne M, Traub RJ. 2011.** A survey of canine tick-borne diseases in India. *Parasit Vectors* 4: 141 [Internet]. Disponible en: <http://www.parasite-sandvectors.com/content/4/1/141>. doi:10.1186/1756-3305-4-141
2. **Almao M, García M, Mujica R. 2013.** *Ehrlichia canis* en el caserío «La Isla», municipio Palavecino, estado Lara. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del estado Lara*. 5(1). [Internet]. Disponible en: <http://revistacmvl.jimdo.com/suscripción/volumen-5/ehrlichia-canis/>
3. **Arraga C. 1992.** Ehrlichiosis canina en Maracaibo, estado Zulia. Reporte de 55 casos. *Rev Cientif FCV-LUZ* 2(2): 30-40.
4. **Arraga-Alvarado CM, Qurollo BA, Parra OC, Berrueta MA, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. 2014.** Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 91: 1161-1165. doi: 10.4269/ajtmh.14-0372
5. **Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Qurollo BA, Saito TB, Maggi RG, Blanton LS, Bouyer D. 2014.** Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit Vectors* 7: 298-304. [Internet]. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/298>. doi:10.1186/1756-3305-7-298
6. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. 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*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145
7. **Ebani VV, Bertelloni F, Torracca B, Cerri D. 2014.** Serological survey of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia canis* infections in rural and urban dogs in Central Italy. *Ann Agric Environ Med* 21: 671-675. doi: 10.5604/12321966
8. **Fleis J. 1981.** Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. New York: Wiley. 336 p.
9. **Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. 1975.** Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 36: 937-940.
10. **Guerrero R. 1996.** Las garrapatas de Venezuela (Acarina: Ixoidae). Listado de especies y clave para su identificación. *Bol Dir Malariol San Am* 36(1-2): 1-23.
11. **Gutiérrez N, Martínez M, Triana-Alonso F. 2009.** Identificación microscópica y molecular de ehrlichias en perros del estado Aragua-Venezuela. *Salus* 12(Sup 1): 197-204 [Internet]. Disponible en: http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/ehrlichias_perros-aragua.pdf
12. **Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. 1978.** Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *J Infect Dis* 137: 182-188.

13. **Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AW. 1999.** Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 37: 2745-2749.
14. **Harrus S, Waner T. 2011.** Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J* 187: 292-296. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.02.001
15. **Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. 1972.** The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere. 4th ed. Utah, USA: Brigham Young University. 40 p.
16. **Little SE. 2010.** Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40: 1121-1140. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.004
17. **Maggi RG, Mascarelli PE, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB. 2013.** Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasit Vectors* 6: 103 [Internet]. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/103>. doi: 10.1186/1756-3305-6-103
18. **Manzanilla J, García M, Moissant E, García F, Tortolero E. 2002.** Dos especies de garrapatas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en perros del estado Aragua, Venezuela. *Entomotrópica* 17: 177-180.
19. **Martínez MC, Gutiérrez CN, Monger F, Ruiz J, Watts A, Mijares VM, et al. 2008.** *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 14: 519-520. doi: 10.3201/eid1403.061304
20. **Nazari M, Lim SY, Watanabe M, Sharma RS, Cheng NA, Watanabe M. 2013.** Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1). [Internet]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001982>. doi: 10.1371/journal.pntd.0001982
21. **Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. 2002.** Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 16: 309-315.
22. **Pérez-Vera C, Kapiainen S, Junnikkala S, Aaltonen K, Spillmann T, Vapalahti O. 2014.** Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. *Parasit Vectors* 7: 285-293. [Internet]. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/285>. doi:10.1186/1756-3305-7-285
23. **Preziosi DE, Cohn LA. 2002.** The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. *Comp Cont Educ Pract* 24: 277-288.
24. **Procajlo AI, Skupieñ EM, Bladowski M, Lew S. 2011.** Monocytic ehrlichiosis in dogs. *Pol J Vet Sci* 14: 515-520.
25. **Quorollo BA, Chandrashekar R, Hegarty BC, Beall MJ, Stillman BA, Liu J, Thatcher B, et al. 2014.** A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infect Ecol Epidemiol* 4. [Internet]. Disponible en: <http://www.infectionecologyandepidemiology.net/index.php/iee/article/view/24699>. doi: 10.3402/iee.v4.24699
26. **Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC, Siregar AG, Pasaribu FH, Malole MB. 1992.** Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J Clin Microbiol* 30: 143-148.
27. **Rojas-Triviño A, Rueda-Hurtado A, Díaz-Molano D, Meza-Cobo N, Benavides-Montaño J, Imbanchi-López K, et al. 2013.** Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Vet Zootecnia* 7(1): 37-48.

28. Santos LG, Melo AL, Moraes-Filho J, Witter R, Labruna MB, Aguiar DM. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 22: 114-118.
29. Silva JN, Almeida Ado B, Boa Sorte Eda C, Freitas AG, Santos LG, Aguiar DM, Sousa VR. 2010. Seroprevalence anti-*Ehrlichia canis* antibodies in dogs of Cuiabá, Mato Grosso. *Rev Bras Parasitol Vet* 19: 108-111.
30. Vieira RF, Biondo AW, Guimarães AM, Dos Santos AP, Dos Santos RP, Dutra LH, et al. 2011. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 20: 1-12. doi: 10.1590/S1984-29612011000100002
31. Vieira RF, Vieira TS, Nascimento Ddo A, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, et al. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55: 335-340. doi: 10.1590/S0036-46652013000-500007