

ARTÍCULO ORIGINAL

Ehrlichiosis monocítica canina en la provincia de Entre Ríos, Argentina: confirmación molecular de casos en la ciudad de Concordia

Sánchez RO^{1*}, Bazzano V², Félix ML², Armúa-Fernández MT², Venzal JM²

¹ ROSLAB Diagnóstico Veterinario, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

² Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas, Facultad de Veterinaria, CENUR Litoral Norte - Salto, Universidad de la República, Uruguay.

* Correspondencia: Ricardo O. Sánchez, ROSLAB Diagnóstico Veterinario, Corrientes 372 (CP 3200) Concordia, Entre Ríos, Argentina. E-mail: ricardosanchez74@gmail.com

Recibido: 13 Marzo 2020. Aceptado: 7 Mayo 2020. Disponible en línea: 8 Mayo 2020
Editor: S. Nava

RESUMEN. El objetivo del siguiente trabajo fue confirmar la presencia de *Ehrlichia canis* por diagnóstico molecular, a partir de muestras de perros con diagnósticos presuntivos, oriundos de la ciudad de Concordia, provincia de Entre Ríos. ADN fue extraído de 14 muestras de sangre de perros con diagnóstico presuntivo de EMC. Para la detección de ADN de *E. canis* se amplificó un fragmento del gen *dsb*, específico de este género, y su confirmación específica se realizó mediante secuenciación. Doce de las 14 muestras mostraron bandas del tamaño esperado. Las secuencias obtenidas mostraron un 98-100% de identidad con secuencias registradas en GenBank para *E. canis*. Además, se amplificó un fragmento del gen ARNr 16S mitocondrial de garrapatas obtenidas de un perro positivo. Las secuencias demostraron que corresponden a *R. sanguineus* sensu stricto (linaje templado). En este estudio se confirma la presencia de *E. canis* en la ciudad de Concordia, Entre Ríos, resultando en una alerta para los médicos veterinarios de la región, a fin de incentivar estrategias de prevención de la enfermedad y control del vector.

SUMMARY. Canine monocytic ehrlichiosis in Entre Ríos province, Argentina: molecular confirmation of cases in Concordia city. The aim of this work was to confirm the presence of *Ehrlichia canis* in blood samples of dogs from Concordia, Entre Ríos Province, Argentina. DNA was extracted in 14 blood samples of dogs with presumptive diagnosis of CME. A PCR protocol targeting *dsb* gene, specific for genus *Ehrlichia* was carried out for detection and species confirmation was carried out by sequencing. Twelve out of 14 samples shown bands of the expected size. The obtained sequences revealed 98-100% identity with *E. canis* sequences registered in GenBank. Moreover, ticks were retrieved from an *E. canis* positive dog and a fragment of mitochondrial ARNr 16S gene was amplified. The obtained sequences were identified as *R. sanguineus* sensu stricto (temperate lineage). This work confirmed the presence of *E. canis* in Concordia city, Entre Ríos province resulting in an alert for veterinary clinicians in this region aiming to encourage prevention strategies of this disease and vector control.

Palabras clave: ehrlichiosis monocítica canina, *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, trombocitopenia, Argentina

Keywords: canine monocytic ehrlichiosis, *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, thrombocytopenia, Argentina

Introducción

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad que afecta caninos domésticos a nivel mundial, de importancia en la clínica veterinaria debido a la gravedad de sus síntomas, produciendo inclusive la muerte de los animales (Harrus et al., 1997). Su agente causal, *Ehrlichia canis*, es una bacteria intracitoplasmática, Gram negativa, que pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, orden Rickettsiales. Morfológicamente es una bacteria pleomórfica y se dispone en forma individual o en agrupaciones compactas (mórfulas) dentro del fagosoma de monocitos, linfocitos y/o macrófagos (Dumler et al., 2001). Esta bacteria es

transmitida a un hospedador susceptible por ninfas y adultos de garrapatas pertenecientes al complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (Bremer et al., 2005; Groves et al., 1975). Tras su inoculación, luego de un período de 8 a 20 días de incubación, el curso de la infección por *E. canis* se puede dividir secuencialmente en una fase aguda (de 2 a 4 semanas de duración), una fase subclínica (meses a años de duración) y una fase crónica. Fiebre, letargia, depresión, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia, citopenias, trombocitopenia, tendencia al sangrado, uveítis, petequias, equimosis subcutáneas, melena, ataxia, disfunción vestibular, edema escrotal, neumonía, entre otras manifestaciones clínicas y alteraciones hematológicas,

han sido descritas en perros con EMC (Codner y Farris-Smith, 1986; Harrus, 2015; Harrus y Waner, 2011; Harrus et al., 1999; Komnenou et al., 2007; Mylonakis et al., 2011; Reardon y Pierce, 1981; Woody y Hoskins, 1991). Durante la fase subclínica pueden observarse alteraciones leves en el hemograma, como citopenias, fiebre intermitente y esplenomegalia. Este estado puede mantenerse por meses o años, o evolucionar hacia la forma crónica y muchas veces fatal de la enfermedad (Waner et al., 1997).

En cuanto al diagnóstico, dentro de los métodos directos, el examen citológico mediante la observación de mórulas en extendidos de sangre periférica tiene baja sensibilidad, aumentando si se utiliza la tinción de la capa leucocitaria (buffy-coat) o linfonódulo (Mylonakis et al., 2003; Woody y Hoskins, 1991). Además, técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación, pueden permitir un diagnóstico prematuro y específico de la EMC. Con respecto a métodos indirectos, existen técnicas serológicas cuali y cuantitativas accesibles para el veterinario clínico, aunque solo indican exposición al agente si no se demuestra la seroconversión (Harrus y Waner, 2011; Iqbal et al., 1994).

En el cono sur de América, se ha demostrado la presencia de al menos dos especies de garrapatas pertenecientes al complejo *R. sanguineus*, cuya distribución y competencia vectorial en la transmisión de *E. canis* son diferentes (Moraes-Filho et al., 2015; Cicuttin et al., 2017). Una corresponde a *R. sanguineus* sensu stricto (descrita anteriormente como *R. sanguineus* s.l. "linaje templado"), que se distribuye en partes de Europa, Argentina, Chile, Uruguay, sur de Brasil y EE.UU., sobre la cual existen escasas evidencias sobre su capacidad vectorial para transmitir *E. canis* (Cicuttin et al., 2017; Nava et al., 2018). En cambio, la otra especie, *R. sanguineus* s.l. "linaje tropical", que en Sudamérica se distribuye principalmente en regiones tropicales, incluyendo el norte de Argentina y Chile y gran parte de Brasil, es un vector comprobado de *E. canis* (Cicuttin et al., 2015; Moraes-Filho et al., 2015; Nava et al., 2018).

Sobre la situación epidemiológica de la EMC por *E. canis* en Argentina, casos clínicos han sido reportados para el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), con la confirmación de *E. canis* mediante detección molecular (Eiras et al., 2013; Cicuttin et al., 2016), así como recientemente en Santa Fe (Tarragona et al., 2019). También ha sido reportada en *R. sanguineus* s.l. en Formosa y en *R. sanguineus* s.s. en Buenos Aires (Cicuttin et al., 2015, 2016, 2017; Borrás et al., 2019). En la provincia de Mendoza se halló evidencia serológica en perros (Mera y Sierra y Neira, 2014). Mientras que para la provincia de San Luis existe un reporte de un canino con hallazgos de mórulas en extendidos sanguíneos y PCR positiva para la familia *Anaplasmataceae* (Aubert et al., 2016). En Chaco el 51% de muestras caninas con sospecha de hemoparásitos fue diagnosticado como *Ehrlichia* sp. en

extendidos sanguíneos y/o de médula ósea (Brunel y Cainzos, 2018).

El objetivo del siguiente trabajo fue confirmar la presencia de *E. canis* por diagnóstico molecular, a partir de muestras de perros con diagnósticos presuntivos, oriundos de la ciudad de Concordia, provincia de Entre Ríos.

Materiales y Métodos

Las muestras utilizadas en el presente estudio corresponden a 53 caninos diagnosticados con presencia de mórulas de *Ehrlichia* sp. durante noviembre de 2017 a diciembre de 2019 en el Laboratorio Mesopotámico de Diagnóstico Veterinario (Concordia, Entre Ríos).

Los diagnósticos se realizaron a partir de muestras de sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), enviadas para hemograma y/o para diagnóstico de hemoparásitos mediante la observación de un extendido sanguíneo y de la capa leucocitaria (buffy coat) teñidos con tinción de May Grunwald-Giemsa. Las mórulas se observaron como formaciones basófilas redondeadas o irregulares en infecciones únicas o múltiples en el citoplasma de monocitos y linfocitos (Figura 1a, b, c). En algunos monocitos se observaron formas cocobacilares difusamente agrupadas (Figura 1d).

Complementariamente, a las muestras enviadas para hemograma, se les realizó además una estimación del número de plaquetas al extendido, tomando el número promedio de plaquetas en 10 campos del área de monocapa a 1000x de magnificación. Valores promedio por debajo de ocho plaquetas por campo fueron considerados como inadecuados (Paltrinieri et al., 2018). Las muestras de sangre positivas mediante extendidos sanguíneos a la presencia de mórulas de *Ehrlichia* sp., fueron conservadas a -20°C. De estas muestras, 14 fueron seleccionadas al azar para realizar la detección molecular de representantes de la familia *Anaplasmataceae* en el Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas de la Universidad de la República (Salto – Uruguay). A partir de 200 µl de sangre se realizó la extracción de ADN utilizando el kit comercial Pure-Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN fue cuantificada con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Con el ADN obtenido se realizó un primer PCR a modo de tamizaje utilizando los cebadores EHR16SD (5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3') y EHR16SR (5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3') que amplifican un fragmento de 345 pb del gen ARNr 16S de la familia *Anaplasmataceae*, incluidos los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Parola et al., 2000). Agua de grado molecular fue utilizada como control negativo y ADN de *Anaplasma marginale* como control positivo.

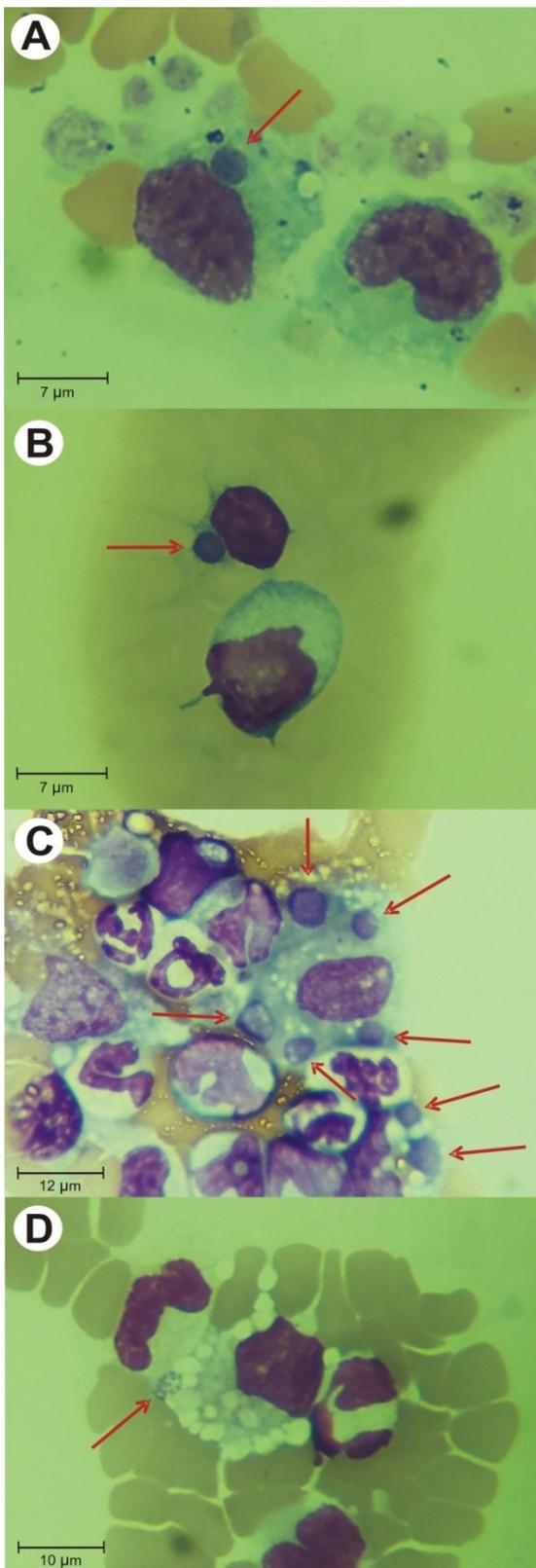


Figura 1: A) Monocito con una mórula compacta de *Ehrlichia* sp. (indicada con flecha roja). B) Linfocito con una mórula compacta de *Ehrlichia* sp. (indicada con flecha roja). C) Monocitos con mórulas múltiples de *Ehrlichia* sp. (indicadas con flechas rojas). D) Monocito con mórula difusa de *Ehrlichia* sp. (indicada con flecha roja).

Posteriormente, a las muestras positivas a esta PCR, se les realizaron otras dos PCRs con cebadores específicos para la detección de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma platys*. La detección de ADN de *Ehrlichia* spp. se realizó mediante una PCR semianidada dirigida al gen *dsb* (Disulfuro oxidoreductasa) siguiendo los protocolos descritos por Doyle et al. (2005) y Almeida et al. (2013). La primera reacción se realizó usando los cebadores Dsb-330 (5'-GATGATGTTTGAAGATATSAAA CAAAT-3') y Dsb-720 (5'-CTATTTACTTCTAAAGTTG ATAWATC-3') que amplifican un fragmento de 401 pb y la segunda reacción con los cebadores Dsb-380 (5'-ATTTTAGRGATTTTCCAATACTTGG-3') y Dsb-720 que amplifican un fragmento de 349 pb. Para la detección de ADN de *A. platys* se utilizaron los cebadores PLATYS (5'-GATTTTGTCTAGCTTGCTATG-3') y EHR16SR que amplifican un fragmento de 678 pb del ARNr 16S siguiendo a Inokuma et al. (2000).

Adicionalmente se colectaron garrapatas de perros presuntivos a EMC, las que fueron determinadas morfológicamente en el laboratorio mediante una lupa estereoscópica binocular, siguiendo las claves propuestas por Nava et al. (2017) y sometidas a extracción de ADN. Las garrapatas fueron seccionadas longitudinalmente, utilizando una de las mitades para la extracción de ADN, la cual se realizó con el kit comercial anteriormente mencionado. Al ADN obtenido se le realizó la PCR descrita anteriormente para determinar la presencia de ADN de la familia *Anaplasmataceae*. Además, para caracterizar a que linaje pertenecen estas garrapatas, se realizó una PCR para amplificar un fragmento de aproximadamente 460 pb correspondiente al gen mitocondrial ARNr 16S utilizando los cebadores 16S+1 (5'-CCGGTCTGAAGCTCAG ATCAAG T-3') y 16S-1 (5'-GCTCAATGATTTTTAAATTGCTGTGG-3') siguiendo a Mangold et al. (1998). Los productos resultantes de las PCRs se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo un intercalante GoodView™ Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co. LTd), y visualizados bajo un transiluminador UV. Los amplicones de tamaño esperado fueron purificados mediante el kit comercial PureLink® Quick PCR Purification kit (Invitrogen, Alemania) y enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Para la determinación de las homologías se compararon con secuencias disponibles en el GenBank utilizando la herramienta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Resultados

De las 14 muestras de sangre de perros con observación previa de mórulas de *Ehrlichia* sp. seleccionadas al azar para realizar el diagnóstico molecular por PCR (Tabla 1, Fig. 1 a-d), 12 de ellas presentaron una banda de tamaño esperado en la primera reacción que amplifica

un fragmento del ARNr 16S de la familia *Anaplasmataceae*. Estas muestras también pudieron ser amplificadas mediante la segunda PCR para el gen *dsb*, específico del género *Ehrlichia* (Tabla 1). Las mismas resultaron negativas a la amplificación del ARNr 16S para *A. platys*. Las secuencias obtenidas del gen *dsb* demostraron tener entre un 98-100% de homología con secuencias depositadas como *E. canis* en Genbank. A partir del ADN de una de las muestras positivas del gen *dsb* (caso perro P1091) se obtuvo una secuencia consenso de 305 pb, la cual fue depositada en GenBank bajo el número de acceso MT163170. Esta secuencia

resultó ser idéntica a secuencias de *E. canis* obtenidas de perros y garrapatas (*R. sanguineus* s.s./s.l.) de diferentes partes del mundo, incluidas secuencias de Brasil, Chile y Argentina. En los hemogramas de los 12 caninos con diagnóstico molecular de *E. canis*, se observó: trombocitopenia en el 100%, anemia en el 92%, linfopenia en el 75%, leucopenia en el 42% y neutropenia en el 25% (Tabla 1).

Tabla 1. - Identificación, fecha, resultados del hemograma y PCR de las muestras de casos presuntivos a EMC seleccionadas para el diagnóstico molecular de *E. canis* de la ciudad de Concordia, Entre Ríos. (+)= Presencia; (-)= Ausencia. * Incluye sólo los animales PCR+ para *E. canis*.

N° de muestra	Fecha de obtención	Anemia	Trombocitopenia	Leucopenia	Linfopenia	Neutropenia	Resultado PCR
P 1079	9/4/2019	+	+	+	+	+	+
P 1080	6/5/2018	+	+	+	+	+	-
P 1081	1/3/2019	+	+	-	+	-	+
P 1082	28/2/2019	-	+	+	+	+	+
P 1083	10/11/2017	+	+	+	+	-	-
P 1084	30/10/2018	+	+	-	+	-	+
P 1085	8/10/2018	+	+	-	-	-	+
P 1086	22/3/2019	+	+	-	-	-	+
P 1087	22/1/2019	+	+	-	+	-	+
P 1088	30/1/2019	+	+	+	+	-	+
P 1089	26/11/2018	+	+	-	+	-	+
P 1090	3/4/2019	+	+	+	+	+	+
P 1091	19/3/2019	+	+	+	-	-	+
P 1092	5/4/2019	+	+	-	+	-	+
Porcentaje		11/12* 92%*	12/12* 100%*	5/12* 42%*	9/12* 75%*	3/12* 25%*	12/14 86%

Solamente se obtuvieron garrapatas del perro P1090, que fueron clasificadas morfológicamente como tres machos y dos ninfas de *R. sanguineus*. Todas las garrapatas resultaron negativas a la amplificación del ARNr 16S de *Anaplasmataceae*. A partir del ADN de dos machos de *R. sanguineus* se amplificó un fragmento del gen mitocondrial ARNr 16S, y se obtuvo una secuencia consenso de 415 pb, depositada en GenBank bajo el número de acceso MT152825, la cual demostró tener

entre 99-100% de homología con secuencias de *R. sanguineus* s.s.

Discusión

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos incluyen una serie de patologías de gran importancia en medicina veterinaria. Su incidencia varía en las

diferentes regiones del mundo asociadas a factores como el aumento poblacional y el tránsito de caninos, abundancia de vectores competentes, población canina susceptible, realidad socioeconómica de la población, calentamiento global, entre otros (Gubler, 2009; Harrus y Baneth, 2005; Irwin, 2002). En este trabajo se confirman casos de EMC mediante diagnóstico molecular de *E. canis* para la ciudad de Concordia, provincia de Entre Ríos (Argentina), en muestras de casos clínicos compatibles donde previamente se habían observado mórulas similares a *Ehrlichia* sp. Los reportes previos de *E. canis* en caninos y garrapatas de nuestro país han sido realizados en Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Santa Fe y Formosa (Eiras et al., 2013; Cicuttin et al., 2015, 2016; Tarragona et al., 2019; Borrás et al., 2019). Su distribución parece ser aún mayor, ya que en Chaco se han reportado un alto porcentaje de perros con mórulas de *Ehrlichia* sp., y existe evidencia por diagnóstico directo y serológico en perros de San Luis y Mendoza (Brunel y Cainzos, 2018; Aubert et al., 2016; Mera y Sierra y Neira, 2014).

Si bien la presencia de *E. canis* está asociada a su principal vector, *R. sanguineus* s.l., hasta el momento, Argentina es el único país del cono sur de América donde se ha logrado determinar *E. canis* en *R. sanguineus* s.s. (mencionada previamente como "linaje templado") y asociarla a casos clínicos de EMC (Cicuttin et al., 2017; Borrás et al., 2019). Esto coincide con nuestro resultado obtenido de las secuencias del gen mitocondrial ARNr 16S, ya que las garrapatas procesadas del perro P1090 se determinaron como *R. sanguineus* s.s. Aunque estas garrapatas resultaron negativas a la presencia de ADN de *E. canis*, se observó la presencia de mórulas en el citoplasma de monocitos y linfocitos sanguíneos y la PCR fue positiva para el caso clínico P1090, además en el hemograma se observaron parámetros compatibles con EMC (Tabla 1).

Este nuevo hallazgo de *E. canis* en la ciudad de Concordia, podría ser explicado basándonos en alguna de las tres hipótesis postuladas por Cicuttin et al. (2017) para el AMBA: 1) una eventual introducción de *R. sanguineus* s.l. con perros migrantes de áreas endémicas del país y posterior establecimiento durante una temporada favorable climáticamente; 2) que efectivamente *R. sanguineus* s.s. posee competencia vectorial; 3) que directamente llegaran perros infectados a Concordia y que *R. sanguineus* s.s. se adaptara a transmitirla. En este aspecto son necesarios estudios moleculares en un mayor número de garrapatas para descartar una eventual colonización de *R. sanguineus* s.l. en la ciudad.

En cuanto al diagnóstico, el método directo mediante extendido sanguíneo carece de sensibilidad, aunque es una herramienta valiosa sobre todo en laboratorios de baja complejidad. La tinción de la capa leucocitaria mejora la sensibilidad de la prueba llevándola al 66 % (Mylonakis et al., 2003). Si bien en algunos casos las mórulas son observadas claramente, existe la posibi-

lidad de encontrar otro tipo de inclusiones que pueden llegar a originar falsos positivos, como por ejemplo restos de colorantes, macrófagos con restos celulares, plaquetas u otro material fagocitado (Mylonakis et al., 2003). La presencia de anemia, trombocitopenia y monocitos activados, es una combinación que fue hallada frecuentemente en animales infectados, aunque no es específico de EMC. El uso del diagnóstico molecular por PCR puede ser complementario a la observación directa de mórulas y a las pruebas serológicas rápidas que son actualmente las de uso de rutina para diagnosticar la EMC. La PCR es un método más sensible, especialmente en la etapa aguda de la infección y detecta la presencia de *E. canis* antes de que ocurra la seroconversión por anticuerpos (Harrus et al., 2012; Martin et al., 2019). Como desventaja, continúa siendo una técnica más costosa y que requiere mayor inversión en equipamiento e instalaciones, y que puede dar falsos negativos en algunas situaciones (Harrus y Waner, 2011).

En la ciudad de Concordia y alrededores otros patógenos han sido diagnosticados y confirmados en perros mediante PCR como, *Leishmania infantum* (Sánchez et al., 2011), *Rangelia vitalii* (Sánchez et al., 2014) y *Trypanosoma evansi* (Bono Battistoni et al., 2016). También existen diagnósticos mediante visualización directa de *Hepatozoon* sp., *Anaplasma* sp., *Trypanosoma* sp. (Sánchez R.O. datos sin publicar). Debido a que estos patógenos pueden solaparse en su sintomatología, es necesario un diagnóstico correcto, para instaurar el tratamiento adecuado. El diagnóstico de *E. canis* mediante PCR y secuenciación pudo ser confirmado en 12 de las 14 muestras de perros estudiadas. En base a los resultados obtenidos, se confirma la presencia de *E. canis* en la ciudad de Concordia, donde la EMC podría ser considerada como una enfermedad emergente y con transmisión de forma autóctona. El precoz diagnóstico de la enfermedad es fundamental para el inicio del tratamiento y lograr un mejor pronóstico de los perros afectados. Dada la amplia distribución de su vector, es de esperar la aparición de más casos a nivel regional por lo cual es fundamental promover el control de vectores mediante uso de productos aprobados para tal fin.

Bibliografía

- Almeida A, Souza T, Marcili A, Labruna M. 2013. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. J. Med. Entomol. 50: 640-646.
- Aubert SR, Rossanigo CE, Crosa P, Serrano D, De Salvo MN, Cicuttin GL. 2016. Un caso de ehrlichiosis en un perro de la provincia de San Luis. Memorias de resúmenes XXI Reunión Científico Técnica de la Asoc. Arg. de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD). Jujuy, Argentina. 6 al 8 octubre 2016.
- Bono-Battistoni MF, Orcellet V, Peralta JL, Marengo R, Plaza D, Brunini A, Ruiz M, Widenhorn N, Sanchez A, Monje L, Cignetti LF. 2016. First report of

- Trypanosoma evansi* in a canine in Argentina. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep. 6: 1-3.
- Borrás P, Sanchez J, Guillemi E, De la Fourniere S, Abadia M, Farber M., Santini MS. 2019. Detección de bacterias de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Rickettsia* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Pergamino, Argentina. Rev. Argent. Salud Pública: 10: 8-13.
- Bremer WG, Schaefer JJ, Wagner ER, Ewing SA, Rikihisa Y, Needham GR, Jittapalapong S., Moore DL, Stich RW. 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitol. 131: 95-105.
- Brunel RA, Cainzos RP. 2018. Frecuencia de hemoparásitos en caninos y felinos en la ciudad de resistencia (Chaco) en un período comprendido entre diciembre 2016 y marzo 2018. Memorias XVIII Congreso Nacional de AVEACA. Bs. As., Argentina. 4 y 5 de octubre de 2018.
- Cicuttin G, De Salvo MN, Silva DA, Brito M, Nava S. 2017. *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato del linaje templado (Acari: Ixodidae), provincia de Buenos Aires, Argentina. FAVE Sección Ciencias Veterinarias 16: 93-96.
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Gury Dohmen FE. 2016. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. Ticks Tick-Borne Dis. 7: 954-957.
- Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. 2015. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. Ticks Tick-Borne Dis. 6: 724-729.
- Codner EC, Farris-Smith LL. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J Am Vet Med Assoc. 189: 47-50.
- Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang Y, Corstvet RE, Hegarty BC, Bloch KC, Li P, Walker DH, McBride JW. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time PCR of the dsb Gene. J. Mol. Diagn. 7: 504-510.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Re-organization 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: 2145-65.
- Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. 2013. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. Comp Immunol Microbiol. Inf. Dis. 36: 169-173.
- 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.
- Gubler DJ. 2009. Vector-borne diseases. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 28: 583-588.
- Harrus S. 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). Vet. J. 204: 239-240.
- Harrus S, Baneth G. 2005. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. Int. J. Parasitol. 35: 1309-1318.
- Harrus S, Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). An overview. Vet. J. 187: 292-296.
- 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.
- Harrus S, Waner T, Bark H. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis - an update. Comp. Cont. Ed. Prac. Vet. 19: 431-444.
- Harrus S, Waner T, Neer M. 2012. *Ehrlichia canis* infection. In: Greene CE (Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. Fourth edition. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri, pp. 227-238.
- Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. J. Clin. Microbiol. 38: 4219-4221.
- Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 32: 1658-1662.
- Irwin P J. 2002. Companion animal parasitology: A clinical perspective. Int. J. Parasitol. 32: 581-593.
- Komnenou AA, Mylonakis ME, Kouti V, Tendoma L, Leontides L, Skountzou E, Dessiris A, Koutinas AF, Ofri R. 2007. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. Vet. Ophthalmol. 10: 137-142.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastratiata (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 84: 478-484.
- Martin PL, De Salvo MN, Cicuttin GL, Arauz MS. 2019. Canine monocytic ehrlichiosis in Buenos Aires, Argentina: comparison of serological and molecular assays. Pesq. Vet. Bras. 39: 649-654.

Mera y Sierra R, Neira, G. 2014. Ocurrencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la provincia de Mendoza. Memorias III Congreso Panamericano de Zoonosis / V Congreso Argentino de Zoonosis. Ciudad de La Plata.

Moraes Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. 2015. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. Plos One 10: e0139386.

Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, Rallis T, Fytianou A. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet. Microbiol. 91(2-3): 197-204.

Mylonakis ME, Borjesson DJ, Leontides L, Siarkou VI, Theodorou K, Koutinas AF. 2011. Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. Vet. Clin. Pathol. 40: 78-83.

Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmo AA. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Elsevier, Academic Press, London. 372 pp.

Nava S, Beati L, Venzal JM, Labruna MB, Szabó MP, Petney T, Saracho-Botterop MN, Tarragona EL, Dantas-Torres F, Santos Silva MM, Mangold AJ, Guglielmo AA, Estrada-Peña A. 2018. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. Ticks Tick-Borne Dis. 9: 1573-1585.

Paltrinieri S, Paciletti V, Zambarbieri J. 2018. Analytical variability of estimated platelet counts on canine blood smears. Vet. Clin. Pathol. 47: 197-204.

Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. 2000. Detection of Ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94: 707-708.

Reardon MJ, Pierce KR. 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. Vet. Pathol. 18: 48-61.

Sánchez RO, Boero CA, Eiras DF, Moré G, Hirigoyen DP, Horta EL, Baneth G. 2011. Case report of canine visceral leishmaniasis in Concordia city, Argentina. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). Buenos Aires, Argentina. 21 al 25 de agosto de 2011.

Sánchez RO, Moré G, Eiras DF. 2014. Piroplasmosis canina por *Rangelia vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) en la ciudad de Concordia, Entre Ríos. Memorias XX Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Tucumán, Argentina.

Tarragona EL, Flores FS, Herrera CL, Dalinger M, Aguirre N, Monje LD, Nava S. 2019. Primer reporte de

un caso de ehrlichiosis monocítica canina en la provincia de Santa Fe, Argentina. FAVE Sección Ciencias Veterinarias 18: 49-54.

Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E., Avidar Y, Keysary A. 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. Vet. Parasitol. 69: 307-317.

Woody B, Hoskins JD. 1991. Ehrlichial Diseases of Dogs. Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 21: 75-98.