



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Ehrlichia canis en caninos y el tratamiento con doxiciclina

TESINA

Para optar el Título de Médico Veterinario

AUTOR

César Daniel Chávez Calderón

LIMA – PERÚ
2014

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar,

A mi madre con mucho amor y cariño dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

A mi padre por haberme apoyado y brindado su cariño incondicionalmente.

A mi esposa y mis hijos que en todo momento fueron mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, y acompañando en todo momento.

Agradezco al Doctor Fernández por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo; al Doctor Juan Espinoza, por el apoyo y el ánimo que me brindó; a la Doctora Nieves con su paciencia y a la Doctora Li por sus comentarios y sus atinadas correcciones.

Gracias también a mi esposa y mis hijos, que fueron los grandes sacrificados a los cuales les robé el tiempo de estar con ellos por hacer este trabajo.

A mi madre, por su gran amor, sacrificio y esfuerzo que es un ejemplo a seguir.

A mi padre, por su comprensión y cariño, que me inspiran a ser mejor cada día.

A mi primo Edgar, por su apoyo y ánimo constante.

A mi cuñada Cecilia, por ayudarme día a día.

Gracias a todos.

CONTENIDO

Índice	i
Lista de figuras.....	iii
Resumen.....	iv
Summary	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Ehrlichiosis Canina	4
2.1.1. Historia.....	4
2.1.2. Clasificación Taxonómica	6
2.1.3. Distribución	7
2.1.3.1. Distribución en el Perú	8
2.1.4. Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC)	9
2.1.5. Patogenia de la EMC	10
2.1.6. Cuadro Clínico de la EMC	12
2.1.6.1. Fase Aguda de la EMC	13
2.1.6.2. Fase Subclínica de la EMC	15
2.1.6.3. Fase Crónica de la EMC.	16
2.1.7. Hallazgos de laboratorio en la EMC	19
2.1.8. Diagnóstico de la EMC	22
2.1.8.1. Métodos directos de diagnósticos de la EMC	22
2.1.8.2. Métodos indirectos de diagnósticos de la EMC	23
2.2. Tratamiento de la EMC	25
2.3. Prevención de la EMC	29
2.4. Inmunopatogenia y respuesta inmunitaria en la EMC	30
2.4.1. Evasión inmunitaria	30
2.4.2. Respuesta inmunitaria frente a <i>Ehrlichia</i> spp.	34
2.4.3. Inmunopatogenia de la EMC	41
2.5. Diagnóstico Diferencial	47
2.6. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	48
2.6.1. Huéspedes	48
2.6.2. Localización en el huésped	48
2.6.3. Ciclo biológico	49
2.6.4. Control	50
2.7. La Doxiciclina	51

2.7.1. Efectos en los microorganismos patógenos y mecanismo de acción.....	53
2.7.2. Farmacocinética	54
2.7.3. Efectos no antimicrobianos	57
III. CONCLUSIONES	64
IV. RECOMENDACIONES	65
V. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Inclusiones en monocitos y exocitosis con ruptura de membrana.....	5
Figura N° 2: Taxonomía actual de la <i>Ehrlichia canis</i>	6
Figura N° 3: Distritos de Lima en los que se identificaron <i>Ehrlichia canis</i>	8
Figura N° 4: Circulación de la <i>Ehrlichia canis</i> en la garrapata	10
Figura N° 5: Transmisión de la ehrlichiosis canina	11
Figura N° 6: Ingreso y liberación de la <i>Ehrlichia canis</i> en un monocito	12
Figura N° 7: Fase Aguda de la ehrlichiosis canina.....	13
Figura N° 8: Fase Aguda de la ehrlichiosis canina y signos clínicos.....	14
Figura N° 9: Fase subclínica de la ehrlichiosis canina	15
Figura N° 10: Importancia del bazo.....	16
Figura N° 11: Fase crónica leve de la ehrlichiosis canina	17
Figura N° 12: Fase crónica grave de la ehrlichiosis canina	18
Figura N° 13: Signos clínicos de la ehrlichiosis canina	18
Figura N° 14: Resumen de la patogenia ehrlichiosis canina	19
Figura N° 15: Perfil analítico de la Ehrlichiosis canina	21
Figura N° 16: Ciclo biológico de la garrapata	50
Figura N° 17: Información general de la Doxiciclina	53
Figura N° 18: Características clínicas de la ehrlichiosis después de 21 días de tratamiento con Doxiciclina.....	55
Figura N° 19: Parámetros hematológicos del tratamiento con Doxiciclina.....	56

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es actualizar la información ya existente sobre la ehrlichiosis canina y así poder realizar diagnósticos más precisos para iniciar el tratamiento lo más temprano posible con el antibiótico de primera elección, la Doxiciclina y así evitar que la enfermedad termine con un desenlace fatal, además de la importancia que va adquiriendo cada día, por la transmisión a los seres humanos, tornándose un problema de salud pública. La ehrlichiosis canina es causada por el agente *Ehrlichia canis* y es transmitido por un vector artrópodo, *Rhipicephalu ssanguineus*. La infección ocurre después que una garrapata ha ingerido sangre de un animal infectado, atacando después a otro animal ocasionando el pasaje del microorganismo vía mecánica. Posterior al período de incubación, presenta tres fases: aguda de 2 a 4 semanas, donde se multiplican dentro de los monocitos; fase subclínica que puede durar hasta 5 años, desaparecen los signos clínicos y una fase crónica con aplasia medular ósea. En Perú la ehrlichiosis canina fue detectada en caninos en 1982. En 2002 se encontró una seroprevalencia de 16.5 % en caninos de tres distritos de Lima; siendo detectada actualmente en 27 distritos; también se demostró la seropositividad del 23.33% de *Ehrlichia canis* en personas. Se incrementa en verano por un incremento de garrapatas. En gatos de España se detectó una seropositividad del 9.9%. El antibiótico a elección es la Doxiciclina, es una tetraciclina semisintética, liposoluble, que se absorbe en el tracto digestivo fácilmente. El antibiótico se une a proteínas y penetra fácilmente en los tejidos alcanzando, tanto en ellos como en sangre, concentraciones mayores que otras tetraciclinas. Por su gran liposolubilidad, su eliminación renal es más lenta que la de la oxitetraciclina; este hecho, unido a su alto grado de absorción, permite que su vida media en suero sea de, aproximadamente, 19.5 horas. Se indica como primera opción, es menos nefrotóxica que otras tetraciclinas; es la droga de elección en infecciones crónicas con evidencia de falla renal. Actúa favoreciendo la fusión entre los fagosomas, donde se encuentran las ehrlichias y los lisosomas. Posee actividad bacteriostática. Se debe mantener el tratamiento durante 28 días.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, caninos, Doxiciclina.

SUMMARY

The aim of this study is to update the existing information on canine ehrlichiosis so we can make more accurate diagnoses to start treatment as early as possible with the first-choice antibiotic, doxycycline and prevent the disease ends with a fatal outcome, in addition to that it is gaining importance every day, because of the transmission to humans, becoming a public health problem. Canine ehrlichiosis is caused by *Ehrlichia canis* agent and it is transmitted by arthropod vector, *Rhipicephalus sanguineus*. The infection occurs after a tick has ingested blood from an infected animal, attacking another animal afterwards causing the passage of the microorganism via mechanics. Subsequent to the incubation period, it has three phases: acute for 2 to 4 weeks, where they multiply inside of monocytes; subclinical phase that can last up to 5 years, the clinical signs disappear and a chronic phase with bone marrow aplasia . In Peru canine ehrlichiosis was detected in dogs in 1982. In 2002 a seroprevalence of 16.5 % was found in dogs in three districts of Lima; Currently being detected in 27 districts; seropositivity of 23.33 % of Ehrlichia canis in people was also demonstrated. It increases in summer by an increase in ticks. In cats from Spain, seropositivity of 9.9 % was detected. The antibiotic of choice is doxycycline; it is a semisynthetic liposoluble tetracycline, which is easily absorbed in the digestive tract. The antibiotic binds to proteins and easily penetrates tissues reaching both inside of them as in blood, higher concentrations than other tetracyclines. For its great lipid solubility, renal elimination is slower than oxytetracycline's; this fact, coupled with its high absorption degree, allows its serum half-life to be approximately 19.5 hours. Indicated as first option, it is less nephrotoxic than other tetracyclines; it is the drug of choice in chronic infections with evidence of renal failure. This enhances fusion between phagosomes, where the Ehrlichia and lysosomes are. It has bacteriostatic activity. Treatment must be maintained for 28 days.

The key words: *Ehrlichia canis*, canine, Doxycycline.

I. INTRODUCCIÓN

Existen muchas enfermedades transmitidas por garrapatas tanto a animales como a humanos en todo el mundo. Entre las principales se encuentran aquellas producidas por rickettsias del género *Ehrlichia*, dentro del género *Ehrlichia*, cuya especie tipo es *Ehrlichia canis* se encuentran incluidas las especies *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* y *E. muris* (Breitschwerdt, 1998).

La ehrlichiosis canina es causada principalmente por el agente *Ehrlichia canis* y es transmitido por un vector artrópodo, *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata parda del perro (Parnell, 2004).

La infección ocurre después que, una garrapata ha ingerido sangre de un animal infectado, de esta forma las secreciones salivales de la garrapata contaminan el área de alimentación en el hospedero susceptible, ocasionando el pasaje del microorganismo vía mecánica (Neer, 2000).

Posterior al período de incubación, se puede observar dos fases: aguda (2 a 4 semanas), en donde los microorganismos se multiplican en células mononucleares (macrófagos y linfocitos) (Ettinger, 1992; Neer, 2000), los perros infectados entran en la fase aguda de la enfermedad que puede durar de 1 a 2 semanas, después continua una fase subclínica de duración variable, donde desaparecen los signos clínicos y finalmente una fase crónica donde encontramos aplasia medular (Waner y Harrus, 2000; Neer, 2000).

En el Perú la ehrlichiosis fue detectada en caninos (ehrlichiosis monocítica canina) (Chavera *et al.*, 1982) y desde ahí se han incrementado el número de casos reportados.

La enfermedad presenta mayor impacto en la época de verano debido a un incremento en el número de vectores transmisores de la enfermedad.

En el 2002 se encontró una seroprevalencia de 16.5 % en Lima Metropolitana en caninos de distritos colindantes a zonas con aguas naturalmente estancadas (Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores) en los meses de febrero a mayo del 2001 (Adrianzen *et al.*, 2003) y en 2006 en Sullana - Piura se encontró una seroprevalencia de hasta 76% (San Miguel, 2006).

La doxiciclina es una tetraciclina semisintética (en concreto, alfa-6-deoxi-5-oxitetraciclina) liposoluble, que se absorbe en el tracto digestivo más fácilmente que la oxitetraciclina (Shaw y Rubin, 1986). Tras su absorción, el antibiótico se une a proteínas y penetra fácilmente en los tejidos alcanzando, tanto en ellos como en sangre, concentraciones mayores que otras tetraciclinas (Van Heerden e Immelman, 1979; Shaw y Rubin, 1986).

Debido a su gran liposolubilidad, su eliminación renal es más lenta que la de la oxitetraciclina; este hecho, unido a su alto grado de absorción en los tejidos, da lugar a que su vida media en suero sea de, aproximadamente, 19.5 horas, en comparación con las 9.5 de la oxitetraciclina (Huber, 1977).

Como tratamiento se utiliza como primera opción, la doxiciclina es menos nefrotóxica que las tetraciclinas y es la droga de elección en las infecciones crónicas con evidencia de falla renal (Ettinger, 1992).

La doxiciclina actúa favoreciendo la fusión entre los fagosomas, donde se encuentran las ehrlichias, y los lisosomas. También posee actividad bacteriostática, se implanta en los ribosomas de la bacteria e inhibe, de este modo, la síntesis de proteína bacteriana (Brouqui y Raoult, 1990).

Se han empleado diversos protocolos de tratamiento con la doxiciclina (Van Heerden & Immelman, 1979; Green y Harvey, 1984), aunque actualmente se aconseja administrar la doxiciclina en dosis diaria de 10mg/kg (Sainz *et al.*, 2000c; Neer *et al.*, 2002).

La recomendación actual (doxiciclina) es la de mantener el tratamiento durante 28 días (Breitschwerdt, 1998b; Sainz *et al.*, 2000c; Neer *et al.*, 2002)

La mayoría de los conocimientos sobre la *Ehrlichia canis*, son basados en estudios de otros microorganismos de características semejantes, pero que han sido estudiados más detalladamente por atacar al ser humano, como es el caso de la *Ehrlichia chaffeensis*, es por eso que es imperativo conocer más sobre la patogenia de la enfermedad, sobre todo en lo relativo a su permanencia por años en algunos perros, evadiendo la respuesta inmune, siendo un reservorio potencial para propagar la enfermedad; saber si otras especies son atacadas por la *E. canis*, determinar si solo la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* el único vector de transmisión. Además determinar el potencial de la Doxiciclina, tanto por sus características como antibiótico, también por sus efectos no antimicrobianos, en lo relativo a la modificación de la respuesta inmune del paciente, atenuando los efectos inmunes desencadenados por la *E. canis*. Teniendo precisos estos conocimientos se podrán realizar tratamientos más oportunos y, sobre todo, una prevención y control más efectivo.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EHRLICHIOSIS CANINA

2.1.1 Historia

Las ehrlichiosis son un grupo de enfermedades de transmisión vectorial causadas por bacterias gram negativas que pueden afectar tanto a animales domésticos y salvajes como al hombre (Cohn, 2003).

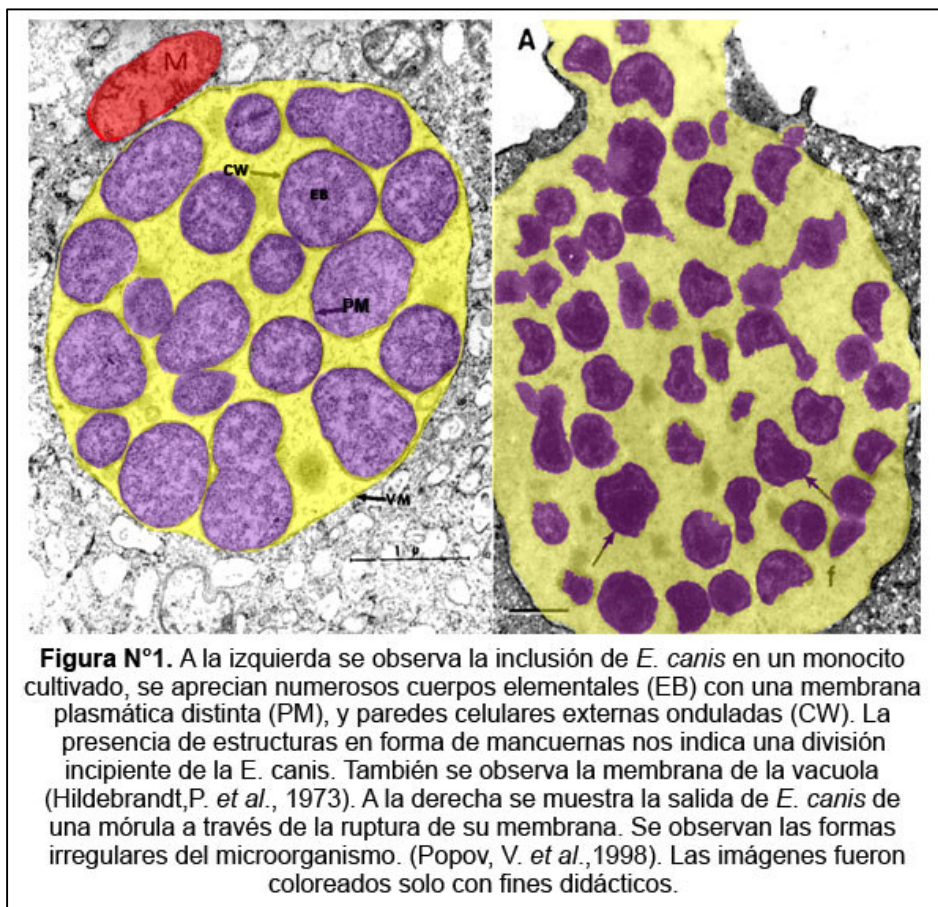
Es causada por un grupo de microorganismos gram negativos intracelulares obligatorios y pleomórficos, que parasitan las células sanguíneas circulantes de hospedadores mamíferos susceptibles, incluido el hombre (Rikihisa, 1991). Se presenta en forma intracitoplasmática en grupos de organismos llamados mórula (Dumler *et al.*, 2001).

En un principio la etiología de este proceso creó confusión, por lo que recibió diversos nombres, como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi, entre los que el más aceptado fue el de “pancitopenia tropical canina”, siendo estos nombres que representan diferentes aspectos de una misma enfermedad (Waner y Harrus, 2000). Aunque finalmente se confirmó que el agente causal de aquella patología era *E. canis* (Huxsoll *et al.*, 1969). A finales de los años 80 se produjo un nuevo repunte en la importancia que se daba a esta enfermedad debido a la descripción de la infección por *E. canis* en el hombre, aunque posteriormente se determinó que aquellos casos en medicina humana estaban causados por otra especie ehrlichial, *E. chaffeensis* (Maeda *et al.*, 1987; Dawson *et al.*, 1991; Neer & Harrus, 2006).

La *Ehrlichia canis* fue identificada por primera vez en 1935 en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard, quienes observaron unos pequeños microorganismos en el interior de los monocitos de perros infestados por garrapatas que habían desarrollado un cuadro

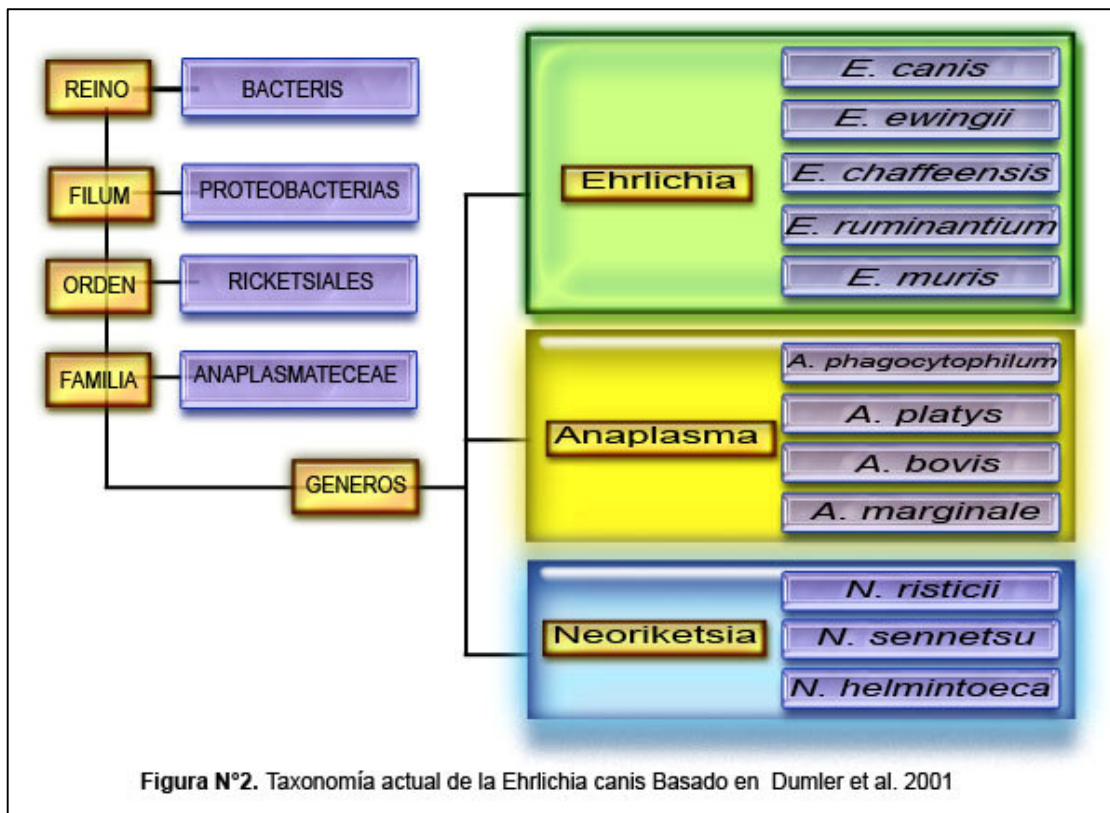
patológico caracterizado por la aparición de fiebre y anemia. En un principio el agente causal de esta enfermedad se denominó *Rickettsia canis*, aunque estudios posteriores llevaron a sustituir este nombre por el actual de *E. canis* (Moshkovskii, 1945). Fue a partir de los años sesenta cuando se comenzó a dar una mayor importancia a la enfermedad, debido a la aparición de un proceso patológico agudo en perros militares británicos y americanos destacados en Singapur y Vietnam, respectivamente, que se caracterizaba por manifestaciones hemorrágicas graves, pancitopenia y emaciación y que causó la muerte de un elevado número de animales afectados (Huxsoll *et al.*, 1970).

En 1971 se describió una ehrlichia granulocítica en perros que años más tarde se denominó *E. ewingii*. Pocos años después se describió un organismo similar a *E. canis*, que parasitaba plaquetas de perros y se denominó *E. platys* (López *et al.*, 1999) (Fig. N° 1).



2.1.2. Clasificación Taxonómica

En 2001 Dumler y colaboradores llevaron a cabo una reorganización de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, que previamente habían sido clasificados en base a sus características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas y clínicas. En la nueva clasificación taxonómica se emplearon análisis genéticos basados en la similitud del RNA ribosómico, del *groESL heat shock operon* y de genes que codifican proteínas de superficie, quedando finalmente la familia Anaplasmataceae dividida en tres genogrupos o géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* (Dumler *et al.*,2001), cuyos miembros producen, por lo general, una elevada reacción antigénica cruzada entre especies de un mismo genogrupos (Cohn, 2003). Por lo tanto, taxonómicamente, estas especies quedarían clasificadas dentro del Reino bacteris, filum Proteobacterias, orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.*,2001) y las diferentes especies quedarían incluidas en los géneros descritos de la siguiente forma: El género *Ehrlichia* incluye las especies *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium* y *E. muris*.; El género *Anaplasma* incluye a *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis* y *A. marginale*.; El género *Neorickettsia* incluye a *N. risticii*, *N. sennetsu* y *N. helmintoeca* (Fig. N° 2).



2.1.3. Distribución

Estos agentes bacterianos requieren para su transmisión de la participación de vectores: garrapatas en el caso de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. (Groves *et al.*, 1975; Cohn 2003; Neer & Harrus 2006) y tremátodos en el caso de *Neorickettsia* spp. (Philip *et al.*, 1954; Neer & Harrus 2006). Esta transmisión vectorial hace que la prevalencia de la infección por cada agente dependa de la distribución geográfica de su vector (Hinrichsen *et al.*, 2001).

La distribución de la Ehrlichiosis canina está relacionada con la distribución del vector *Rhipicephalus sanguineus* y se ha descrito su ocurrencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América (Waner *et al.*, 2000; Baneth, 2006).

En América existe evidencia serológica en: Costa Rica, Estados Unidos de América (EEUU), Chile y México (Meneses, 1995; Murphy *et al.*, 1998; López *et al.*, 1999; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005); en Perú (Chavera *et al.*, 1982), Cuba (León *et al.*, 2008), Nicaragua (Rivas V. *et al.*, 2010), Venezuela (Quijada J. *et al.*, 2012), Colombia (Carrillo L., *et al.*, 2012), Argentina (Eiras *et al.*, 2013), y evidencia molecular en: Costa Rica, Venezuela, EEUU, Brasil y México (Pérez *et al.*, 1996; Breitschwerdt *et al.*, 1998; Dagnone *et al.*, 2003; Hori-Oshima *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2011), también en Chile (López J. *et al.*, 2012). Habiéndose detectado en Venezuela como agente infeccioso de humanos (Pérez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 2006).

Existen varios estudios sobre *E. canis* en el continente sudamericano. En Mina Gerais, Brasil, se ha reportado un 16,00% de ehrlichiosis canina (Moreira *et al.*, 2002).

En el año 1998 fue diagnosticada por primera vez la ehrlichiosis canina en Santiago de Chile, en perros provenientes de la comuna de Puente Alto, al sur de Santiago. Desde ese año y hasta la fecha se ha ido incrementando el número de casos en toda la región Metropolitana, constituyéndose en una enfermedad cada vez más común, en los meses de primavera y verano (López *et al.*, 1999).

En el estado Zulia, Venezuela, se reporta un 83,60% de caninos positivos en frotis sanguíneos coloreados (Arraga, 1992). El año 1996 en Venezuela se reporta el primer caso de ehrlichiosis humana en Maracaibo (estado Zulia), en una niña de 17 meses de edad, quien presentaba complicaciones pulmonares, hepáticas, esplénicas, renales y hematológicas incluyendo

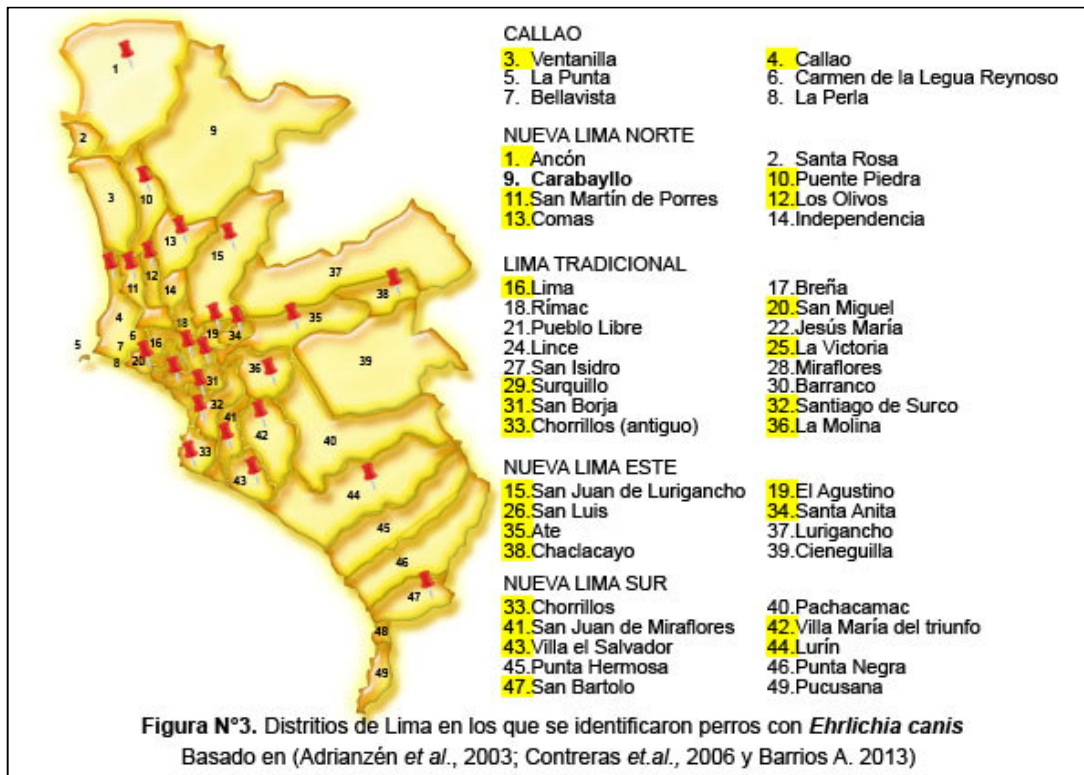
pancitopenia y coagulación intravascular diseminada (CID), el diagnóstico inicial fue realizado usando frotis de capa blanca (Arraga *et al.*, 1996).

En un estudio realizado con perros de clínicas veterinarias y perros callejeros de Caracas, hallaron ehrlichias en el citoplasma de las plaquetas, en el 33,00% de los perros de las clínicas y en el 65,00% de los perros callejeros,(Tami *et al.*,1996),en un estudio, en el municipio Mariño del estado Nueva Esparta, para evaluar la incidencia de ehrlichiosis en caninos mediante frotis en capa blanca, señala que el porcentaje de incidencia fue de 60,50%, representado por 23 casos positivos de las 38 muestras analizadas (Fermín, 2005).

2.1.3.1 Distribución en el Perú

En Lima Perú, se encontró el 16,50% de perros positivos a ehrlichiosis en los distritos de Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores, que constituye una cifra inicial de la situación de la ehrlichiosis canina en nuestro país (Adrianzén *et al.*, 2003).

También en Lima se reportaron caninos seropositivos en los siguientes distritos: Santa Anita, Callao, San Juan de Miraflores, San Juan de Lurigancho, Comas, San Martín de Porras,



Chorrillos, la Molina y San Bartolo (Barrios A., 2013).

Además se cuentan con los datos de una población canina positivos a ehrlichiosis canina, provenientes de distintos distritos de Lima, los cuales son: Ate, Santiago de Surco, San Juan de Lurigancho, Chaclacayo, Lurín, El Agustino, Santa Anita, Lima Cercado, Villa el Salvador, Callao, La Victoria, San Luis, Villa María del triunfo, Surquillo, La Molina, San Juan de Miraflores, San Borja, Ancón, Los Olivos y Puente Piedra (Contreras *et al.*, 2006) (Fig. N° 3).

2.1.4. Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC)

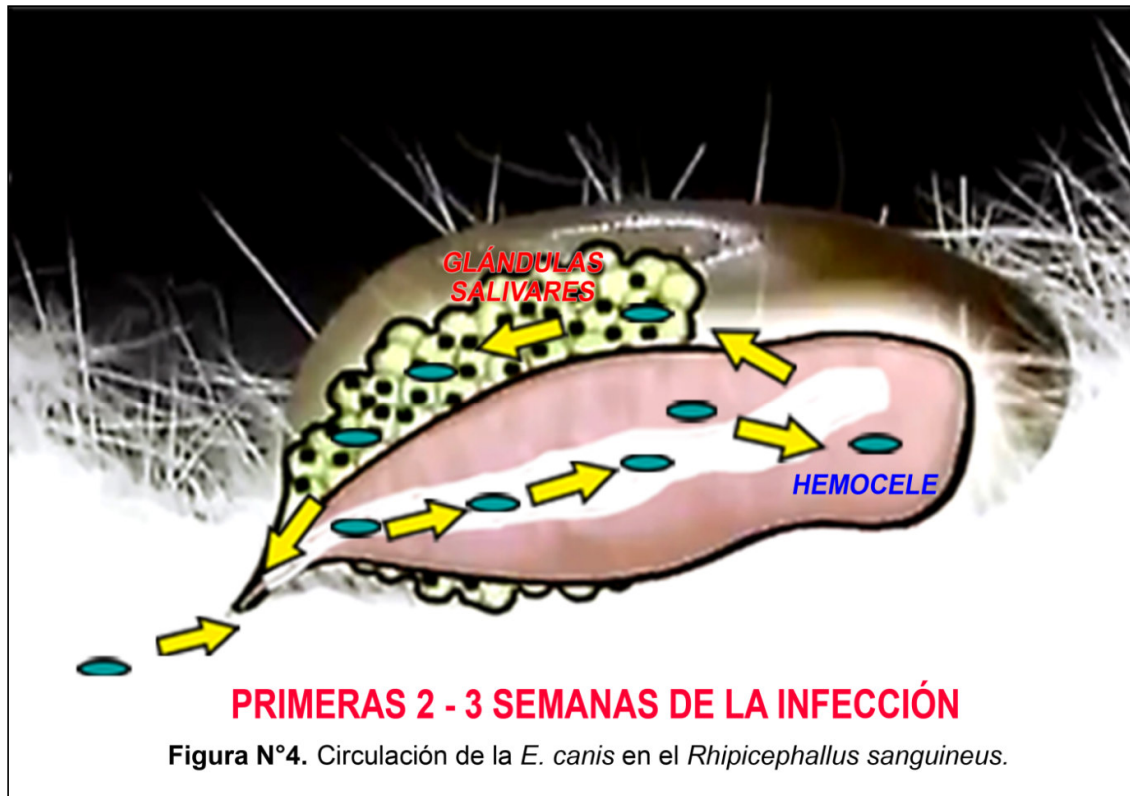
Generalmente se refiere a la enfermedad causada por *E. canis* como ehrlichiosis monocítica canina (EMC), debido a su tropismo por las células monocíticas, aunque a lo largo de la historia ha recibido numerosas denominaciones, como tifus canino, fiebre hemorrágica canina, síndrome hemorrágico idiopático, rickettsiosis canina, enfermedad del perro rastreador o pancitopenia tropical canina (Woody & Hoskins, 1991).

E. canis puede infectar, además del perro, a otras especies animales, especialmente miembros de la familia *Canidae*, como coyotes, lobos, zorros y chacales (Stiles, 2000), antes se ha sugerido que *E. canis* u otra especie estrechamente relacionada podría ser capaz de infectar al gato e, incluso, al hombre (Pérez *et al.*, 1996; Breitschwerdt *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2009; Ayllón *et al.*, 2009). Ahora se ha demostrado en un estudio en España que el 9.9% fueron seropositivos a *E. canis* (Ayllón, T., 2010) y también en nuestro país se encontró seropositividad del 23.33% en personas que realizan actividades veterinarias y/o estuvieron en contacto con animales que sufrieron ehrlichiosis canina (Paulino, A., 2011).

La enfermedad afecta a animales de cualquier edad, desde 2 meses hasta los 14 años (Codner y Farris-Smith, 1986).

El vector de esta bacteria gramnegativa es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, probablemente la garrapata más ampliamente distribuida en el mundo (Groves *et al.*, 1975), aunque experimentalmente también *Dermacentor variabilis* puede transmitir a *E. canis* (Johnson *et al.*, 1998). El *R. sanguineus* se infecta al ingerir sangre de un animal infectado, de forma más probable durante las primeras 2-3 semanas de la infección, ya que en este período existe un mayor número de leucocitos con *E. canis* en la sangre circulante (Woody & Hoskins, 1991).

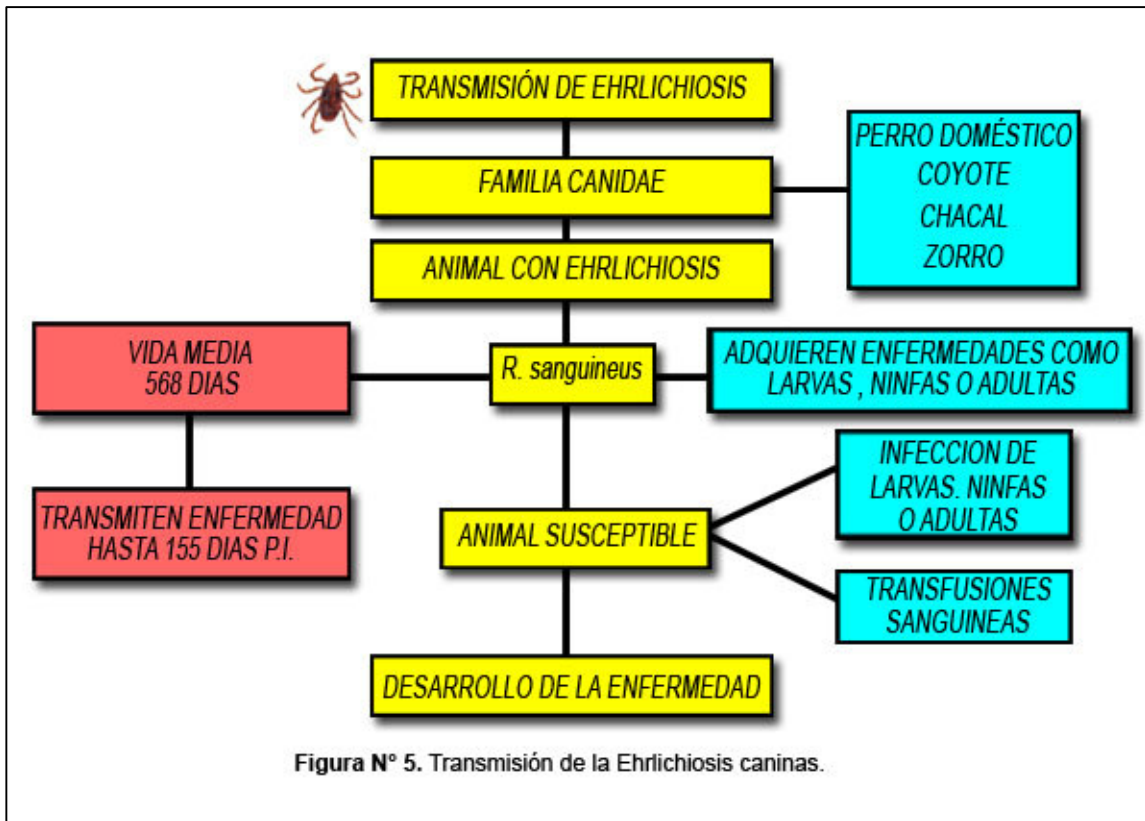
Las *E. canis* llegan al epitelio intestinal y penetran en la cavidad corporal de la garrapata (el hemocele) acompañados del agua y de los iones en exceso que son aprovechados por las glándulas salivares para formar la saliva que será de nuevo inoculada, en ese o en otro hospedador, permitiendo la transmisión de los agentes infecciosos ingeridos con su comida. (Tatchell, 1967; Sauer *et al.*, 1986; Cupp, 1991)(Figura N° 4).



El modo de transmisión es transtadial, pero no transovárico, y se ha observado que la garrapata puede transmitir la infección al perro susceptible hasta 155 días después de haber ingerido al agente (Lewis *et al.*, 1977).

2.1.5. Patogenia de la EMC

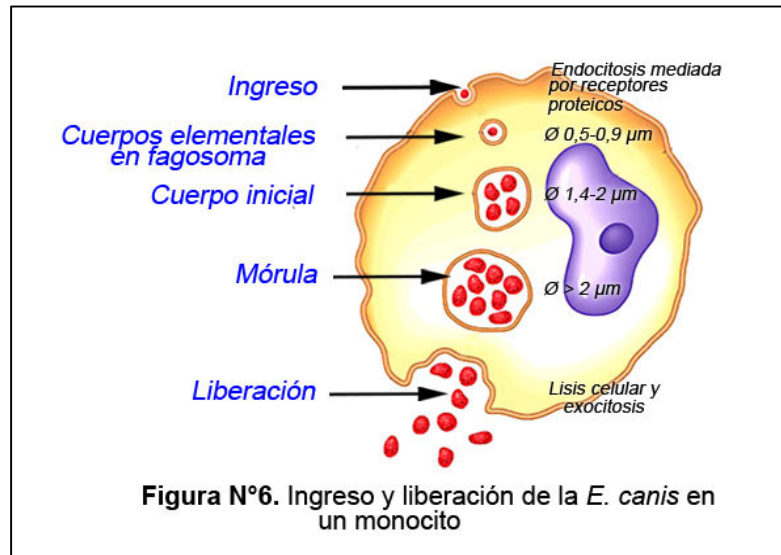
La infección natural en el perro se produce cuando la garrapata infectada se alimenta, ingiriendo la sangre y, a la vez, contaminando con sus secreciones salivares el punto donde se ha fijado. También se ha descrito la posibilidad de una transmisión yatrogénica mediante transfusiones sanguíneas procedentes de perros con EMC (Neer & Harrus, 2006) (Fig. N° 5).



Posteriormente, *E. canis* se replica en las células mononucleares de nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea (Reardon & Pierce, 1981a), en los que penetra por endocitosis mediada por receptores proteicos de la superficie celular (Messick & Rikihisa, 1993).

En el interior de su célula diana, estos microorganismos inicialmente se desarrollan en forma de lo que se denominan “cuerpos elementales”, con un diámetro de 0,5-0,9 μm (Nyindo *et al.*, 1971).

Dichos cuerpos elementales aumentan de tamaño, se replican por fisión binaria y se agrupan, pasando a ser los denominados “cuerpos iniciales”, de 1,4-2 μm de diámetro, que continúan replicándose y agrupándose y, por tanto, aumentando de tamaño, para dar lugar a las “mórulas”, colonias bacterianas rodeadas por una membrana vacuolar, que poseen un diámetro mayor a 2 μm y que son denominadas así por su forma típica (Nyindo *et al.*, 1971). Los microorganismos se liberan de la célula hospedadora por lisis celular y exocitosis (Rikihisa, 1991). Las mórulas contienen 100 o más cuerpos de *Ehrlichia canis* (Waner *et al.*, 2000; Baneth 2006) (Fig. N° 6).



2.1.6. CUADRO CLÍNICO DE LA EMC

Una gran variedad de factores, incluso el tamaño del inóculo de *E. canis*, pueden influir en el curso y el resultado de la infección. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del organismo. Un análisis de inmunotransferencia de respuesta de IgG a *E. canis* ha mostrado que puede existir diversidad antigénica entre organismos de *E. canis* de distintas partes del mundo y ha sugerido que este hecho puede afectar la gravedad de la enfermedad. (Neer, 1995).

La enfermedad concomitante con otros parásitos transmitidos por garrapatas u otros patógenos puede afectar también la gravedad y las manifestaciones de la enfermedad. Es posible que los animales inmunodeficientes desarrollen manifestaciones más graves y es más probable que muestren gran cantidad de mórulas circulantes. No existe predilección de edad ni sexo en EMC; sin embargo, parece que los Pastores alemanes son más susceptibles que otras razas. Es más, la enfermedad en esta raza es más grave y presenta un pronóstico más débil que en otras. Puede atribuirse a la variación de susceptibilidad de la raza a diferencias raciales en la habilidad para desarrollar respuestas inmunes humorales o celulares adecuadas, o ambas. Se observa depresión de la respuesta inmune celular a la infección por *E. canis* en Pastores alemanes comparados con Beagle, mientras que no se registraron diferencias significativas en la respuesta inmune humoral entre las dos razas. (Nyindo, *et al.*, 1991).

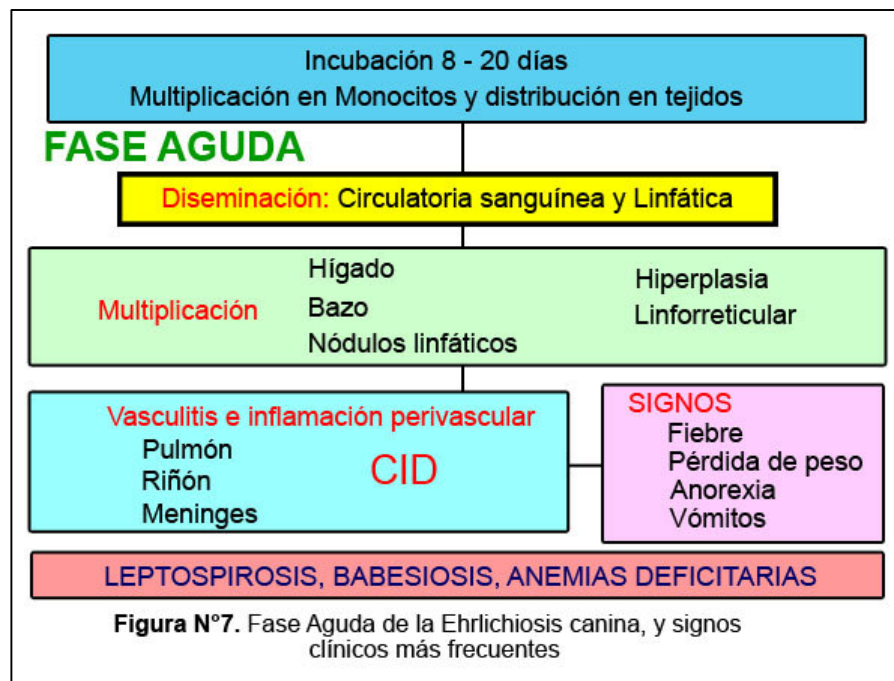
El período de incubación de la EMC puede variar en la infección natural entre 8 y 20 días (Hibler *et al.*, 1986), tras el que se describen clásicamente tres fases de la enfermedad: aguda, subclínica y crónica. Estas fases han sido descritas en las infecciones experimentales y, sin

embargo, en la infección natural no son fácilmente distinguibles entre sí (Woody & Hoskins, 1991).

2.1.6.1. FASE AGUDA DE LA EMC

Después de la entrada y replicación en el interior de las células monocíticas de *E. canis* se produce la fase aguda de la enfermedad, que consiste en la multiplicación y diseminación por la circulación sanguínea o linfática de las bacterias y que habitualmente dura entre dos y cuatro semanas (Huxsoll *et al.*, 1970; Hibler *et al.*, 1986). Esta diseminación de *E. canis* por el organismo le permite distribuirse por aquellos órganos que presentan una población numerosa de fagocitos mononucleares, como son el hígado, bazo y nódulos linfáticos, lo que da como resultado el desarrollo de una hiperplasia linforreticular y el consiguiente aumento de tamaño de estos órganos (Reardon & Pierce, 1981a).

Pero además de afectar a hígado, bazo y nódulos linfáticos, *E. canis* se disemina por otros órganos, produciendo vasculitis e inflamación perivascular en pulmón, riñón y meninges y es posible que se desarrolle una coagulación intravascular diseminada (Reardon & Pierce, 1981a, Hibler *et al.*, 1986).



Los signos clínicos observados durante esta fase son inespecíficos (Harrus *et al.*, 1999), y es probable confundirlos con otras infecciones (leptospirosis, babesiosis y anemias deficitarias),

encontrándose frecuentemente fiebre, pérdida de peso, apatía, anorexia y vómitos (Parnell, 2004), además de secreción óculo-nasal, palidez de mucosas y, en ocasiones, linfadenomegalia, esplenomegalia y edema en extremidades o escroto (Huxsoll *et al.*, 1970; Woody & Hoskins, 1991; Sainz, 1996; Neer & Harrus, 2006). También pueden presentarse signos hemorrágicos, aunque éstos son más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad (Neer & Harrus, 2006) (Fig. N° 7).

En ocasiones pueden presentarse durante esta fase signos oculares, como conjuntivitis, opacidad corneal, uveítis anterior, panuveítis, hipema, hemorragias retinianas, desprendimiento de retina o glaucoma (Harrus *et al.*, 1998a; Walser-Reinhardt *et al.*, 2012). Los trastornos hemorrágicos, tanto sistémicos como oculares que pueden aparecer en perros con ehrlichiosis, son debidos a la trombocitopenia (Breitschwerdt, 1987; Troy y Forrester, 1990; Kern, 1994; Nelson y Couto, 1995), sin embargo, se han descrito también hemorragias oculares con valores de plaquetas relativamente normales. Esto puede ser debido a una disfunción plaquetaria por la aparición en el suero de anticuerpos antiplaquetas que se unen a los receptores glicoproteicos plaquetarios (Harrus *et al.*, 1998c); asimismo, se ha observado que los linfocitos de perros infectados con *E. canis* producen un factor inhibidor de la migración de plaquetas, distinto del anticuerpo antiplaquetario, que contribuye a la trombocitopatía (Kakoma *et al.*, 1978).

Se ha demostrado que este factor inhibe la formación de pseudópodos por las plaquetas y torna a las afectadas redondas, agrupadas y permeables. Además la hiperglobulinemia tiene un efecto inhibitor de la migración y adherencia de plaquetas circulantes (Greene, 1997).

También pueden aparecer signos respiratorios, entre los que destacan disnea, exudado oculonasal y aumento de la intensidad de los sonidos respiratorios, que pueden deberse al desarrollo de una neumonía intersticial (Codner *et al.*, 1985) (Figura 8).



2.1.6.2. FASE SUBCLÍNICA DE LA EMC

En la mayoría de los animales, la fase aguda se resuelve espontáneamente, progresando la enfermedad a la fase subclínica (Codner & Farris-Smith, 1986) e, incluso, se ha descrito que algunos perros son capaces de eliminar *E. canis* gracias al desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada (Eddlestone *et al.*, 2007). Durante la fase subclínica el perro únicamente muestra alteraciones biopatológicas, entre las que destacan, la trombocitopenia e hiperglobulinemia (Fig. N°9).

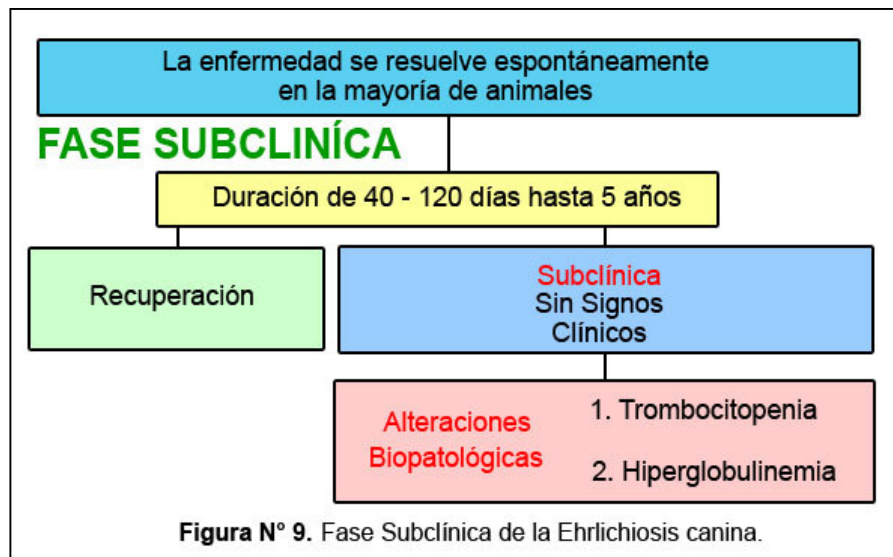


Figura N° 9. Fase Subclínica de la Ehrlichiosis canina.

Los resultados de infecciones experimentales indican que es más probable que el bazo aloje organismos de *E. canis* durante la fase subclínica de EMC y que sea el último órgano antes de eliminarlo. Se cree que el bazo cumple un papel importante en la patogénesis y la expresión de la enfermedad. Los perros a los que se les realizó esplenectomía y fueron infectados de forma experimental con *E. canis* mostraron enfermedad clínica leve en comparación con perros sin esplenectomía (Harrus, *et al.*, 1998c) (Figura N° 10).

Clínicamente el animal parece sano, desapareciendo la fiebre y demás sintomatología observada en la fase anterior y recuperando el peso perdido (Woody & Hoskins, 1991). La duración de esta fase puede ser muy variable; así, se ha descrito en infecciones experimentales una duración de entre 40 y 120 días para esta fase (Woody & Hoskins, 1991), mientras que en la infección natural puede durar hasta 5 años (Codner & Farris-Smith, 1986).



Figura N° 10. Es más probable que el bazo aloje organismos de *E.canis* durante la fase subclínica de EMC y que sea el último órgano antes de eliminarlo. Se cree que el bazo cumple un papel importante en la patogénesis y la expresión de la enfermedad.

2.1.6.3. FASE CRÓNICA DE LA EMC

No se conocen con exactitud los factores que pueden influir en la progresión de la enfermedad hacia la fase crónica y parece que aquellos animales que son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada pueden eliminar el agente (Woody & Hoskins, 1991; Neer & Harrus, 2006).

Es muy frecuente que la EMC se diagnostique durante la fase crónica de la enfermedad (Cohn, 2003). Algunos autores consideran que es más apropiado diferenciar una fase crónica leve y una fase crónica grave (Woody & Hoskins, 1991). La gravedad de esta fase dependerá de varios factores, como la virulencia de la cepa de *E. canis*, el estado inmunitario del perro, su edad, su raza, la existencia de enfermedades concurrentes o el estrés (Nyindo *et al.*, 1980, Woody & Hoskins, 1991). De nuevo en esta fase podemos encontrar signos clínicos inespecíficos, similares a los descritos durante la fase aguda, entre los que destacan la aparición de letargia, anorexia y pérdida de peso. En la exploración física con frecuencia encontraremos linfadenomegalia, fiebre, palidez de mucosas y esplenomegalia (Harrus *et al.*, 1997, Mylonakis *et al.*, 2004).



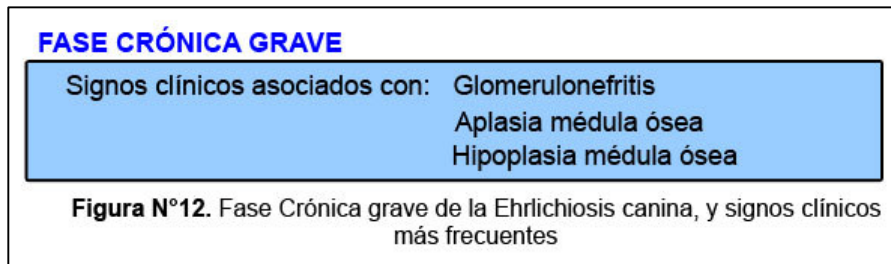
Asimismo, es frecuente el hallazgo de signos hemorrágicos, como epistaxis, melena, petequias y/o equimosis, hipema, hemorragias retinianas y hematuria (Harrus *et al.*, 1997, Frank & Breitschwerdt, 1999; Mylonakis *et al.*, 2004).

En ocasiones pueden observarse alteraciones oftalmológicas, principalmente uveítis anterior y diferentes cambios retinianos, que pueden conducir, incluso, a la ceguera del animal (Frank & Breitschwerdt, 1999, Neer & Harrus, 2006). Probablemente debido a hemorragias, vasculitis o infiltración plasmocitaria perivascular en las meninges (Hibler *et al.*, 1986). Pueden aparecer signos neurológicos, como ataxia, paraparesia, déficit en la propiocepción o nistagmo (Woody & Hoskins, 1991, Frank & Breitschwerdt, 1999). Algunos perros con EMC pueden presentar signos locomotores debidos a polimiositis o poliartritis, cuya causa puede ser el

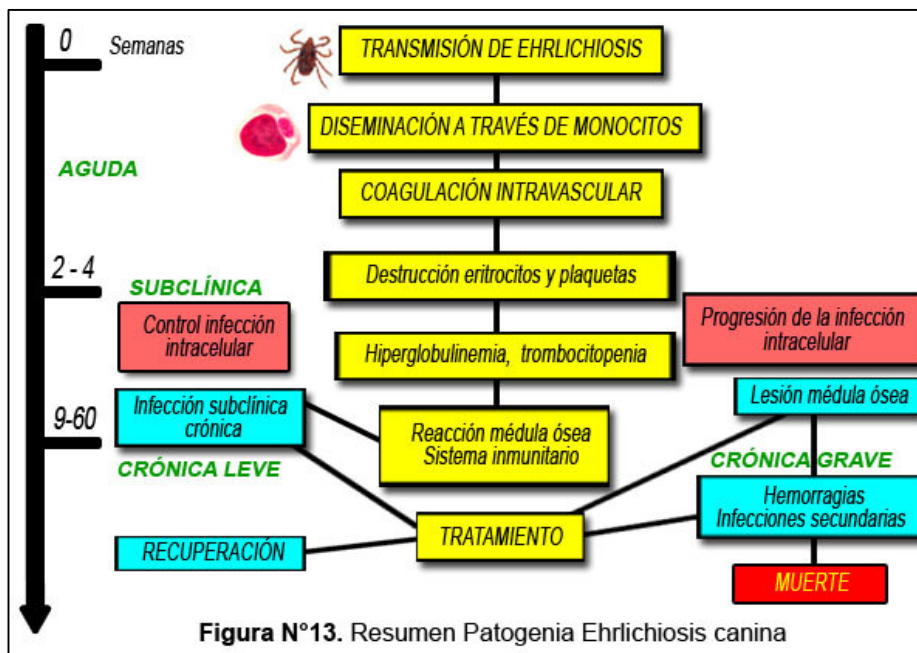
desarrollo de hemartrosis o el depósito de inmunocomplejos. Sin embargo, la aparición de esta sintomatología se asocia en la mayoría de los casos con especies granulocitotrópicas, como *E. ewingii* o *A. phagocytophilum* (Cowell *et al.*, 1988, Neer & Harrus, 2006).

Además, se ha descrito la posibilidad de aparición de signos respiratorios, con exudado nasal, disnea y tos, como consecuencia de una neumonía intersticial (Reardon & Pierce, 1981a), y signos reproductivos, con esterilidad, muerte neonatal y abortos (Woody & Hoskins, 1991) (Fig.Nº 11).

En la fase crónica grave de la EMC pueden aparecer signos clínicos asociados con el desarrollo de glomerulonefritis y/o hipoplasia o aplasia de médula ósea, que se asocian con un mal pronóstico de la enfermedad (Frank & Breitschwerdt, 1999; Cohn, 2003) (Fig.Nº 12).



En las infecciones naturales por *E. canis* el hecho de que la sintomatología pueda ser similar en la fase aguda y en la fase crónica hace que no siempre sea posible diferenciarlas clínicamente (Fig.Nº 13 y Fig. Nº 14).



SIGNOS CLÍNICOS EHRlichiosis CANINA

FASE AGUDA



FASE CRÓNICA

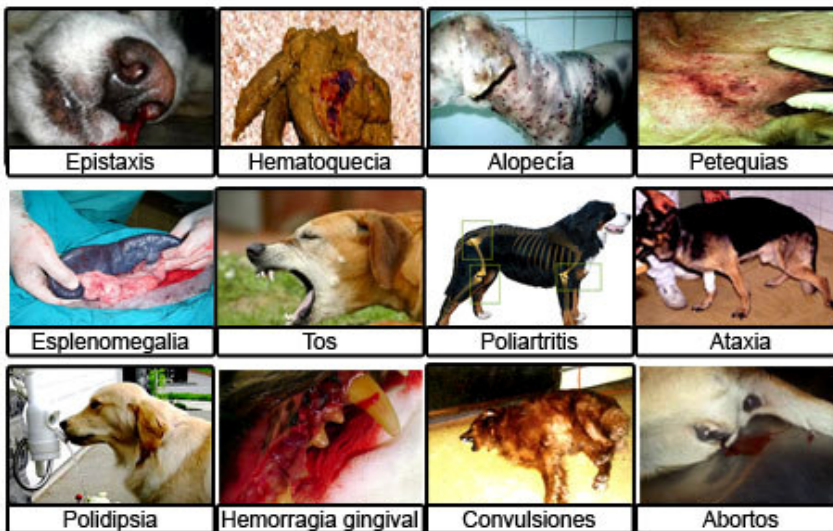


Figura N° 14 Signos clínicos más representativos de la Ehrlichiosis canina

2.1.7. HALLAZGOS DE LABORATORIO EN LA EMC

Como se ha comentado, la infección por *E. canis* en el perro puede cursar con una sintomatología muy poco específica o, incluso, hacer que los animales permanezcan asintomáticos durante largos períodos de tiempo, por lo que no es infrecuente que sean los hallazgos de la analítica sanguínea los que nos hagan sospechar de esta enfermedad.

Entre los cambios en la hematología que con mayor frecuencia se describen en la EMC destaca la trombocitopenia, que puede aparecer tan pronto como a los 15-20 días tras la infección y que puede mantenerse durante todas las fases de la enfermedad (Huxsoll *et al.*, 1970; Woody & Hoskins, 1991; Harrus *et al.*, 1997; Frank & Breitschwerdt, 1999; Mylonakis *et al.*, 2004; Neer & Harrus, 2006).

Sin embargo, es importante destacar que es posible encontrar animales con recuentos plaquetarios normales, por lo que no debe descartarse la ehrlichiosis por la ausencia de trombocitopenia (Neer & Harrus, 2006). Además de un descenso en el número de plaquetas, pueden aparecer desórdenes de la funcionalidad plaquetaria, principalmente debidas a alteraciones de la agregación y migración en sangre (Kakoma *et al.*, 1978).

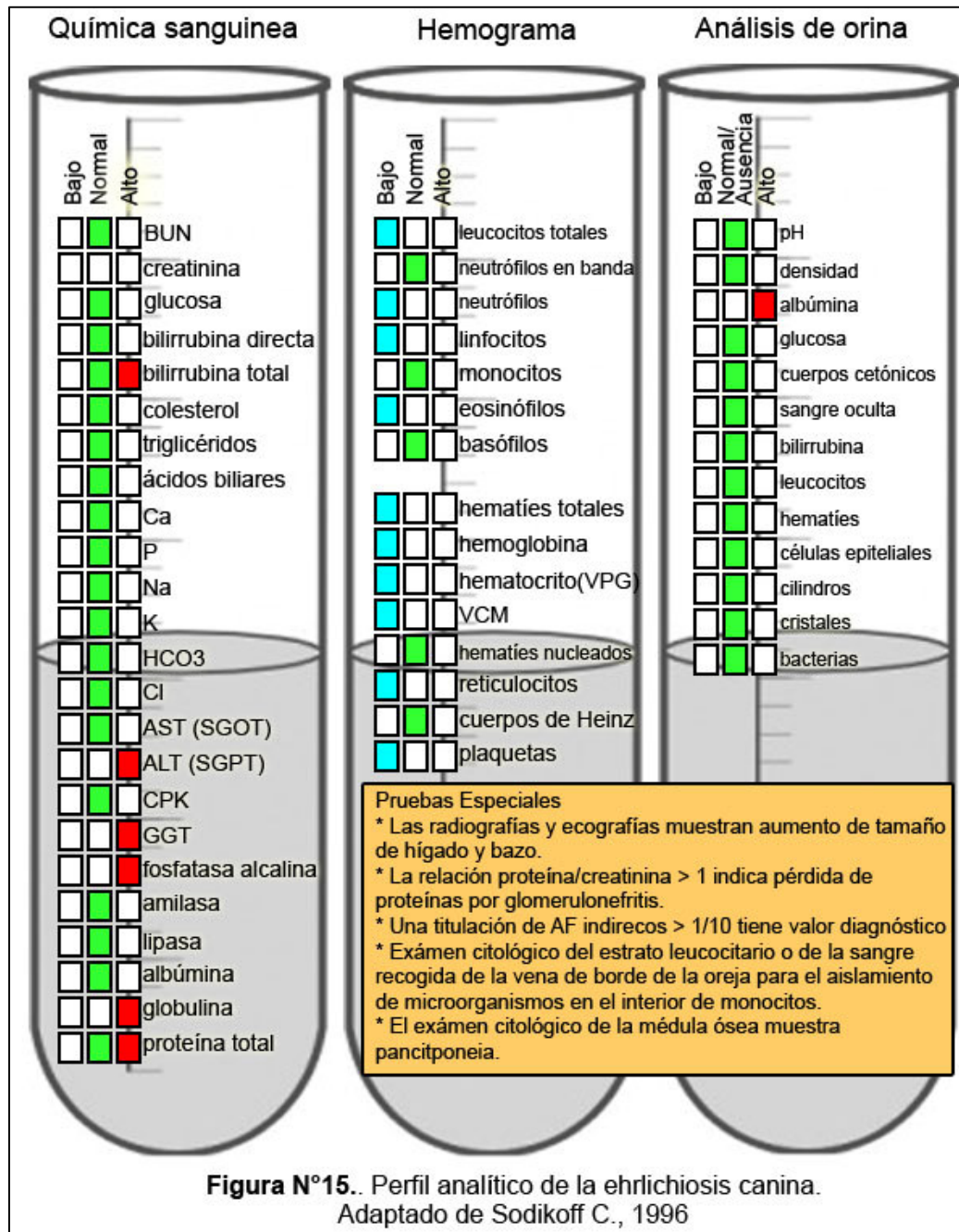
También es frecuente observar en el curso de la EMC la existencia de anemia (Harrus *et al.*, 1997; Frank & Breitschwerdt, 1999), que puede ser más o menos intensa y que en la fase aguda de la enfermedad suele ser regenerativa debido al aumento de la destrucción de hematíes por mecanismos inmunológicos (Reardon & Pierce, 1981a).

En la fase crónica de la EMC la anemia observada es no regenerativa, debido a la destrucción continuada de eritrocitos, a la pérdida crónica de sangre y a la existencia de una hipoplasia o aplasia de médula ósea (Woody & Hoskins, 1991).

La infección por *E. canis* puede producir tanto leucopenia como leucocitosis, aunque ésta última es menos frecuente. Se ha sugerido que en las fases iniciales el secuestro leucocitario por procesos inmunológicos puede dar lugar a la aparición de leucopenia (Reardon & Pierce, 1981a), mientras que en la fase crónica podría deberse a la aplasia medular mencionada (Neer & Harrus, 2006).

Dentro de la serie blanca pueden encontrarse diferentes alteraciones, como neutropenia, linfocitosis o linfopenia y monocitosis, aunque estos hallazgos pueden ser muy variables (Mylonakis *et al.*, 2004). La hiperproteinemia por hiperglobulinemia parece ser el hallazgo más frecuente en la bioquímica sanguínea en los perros con EMC (Harrus *et al.*, 1997b; Frank & Breitschwerdt, 1999; Neer *et al.*, 2002; Mylonakis *et al.*, 2004; Harrus & Waner, 2010).

Esta hiperglobulinemia suele deberse a una gammapatía policlonal, pero también se ha descrito la presentación de gammapatías monoclonales (Breitschwerdt *et al.*, 1987, Neer *et al.*, 2002). A menudo se asocia esta hiperglobulinemia con la presencia de hipoalbuminemia, que puede deberse, entre otros, a la existencia de proteinuria, pérdida de peso, malnutrición, hepatopatía o a un intento de compensación de la hiperproteinemia (Hibler *et al.*, 1986; Woody & Hoskins 1991).



También se han descrito en la bioquímica sanguínea elevaciones de algunas enzimas hepáticas (Harrus *et al.*, 1997; Mylonakis *et al.*, 2004), así como de la creatinina. Este aumento de la creatinina podría tener un origen prerrenal (por deshidratación) o renal (por glomerulonefritis o plasmocitosis intersticial renal) (Breitschwerdt *et al.*, 1987) (Fig. N° 15).

2.1.8. DIAGNÓSTICO DE LA EMC

Los signos clínicos y las alteraciones analíticas observadas pueden sugerir la existencia de una EMC, pero, debido a la inespecificidad mencionada, no son concluyentes, por lo que es necesario recurrir a pruebas analíticas específicas que determinen de forma directa o indirecta la infección por *E. canis*.

2.1.8.1. MÉTODOS DIRECTOS DE DIAGNÓSTICO DE LA EMC

Los métodos directos de diagnóstico de EMC se basan en la detección u observación del agente etiológico a partir de muestras obtenidas del animal sospechoso. La observación de mórulas de *Ehrlichia* spp. en el interior de los leucocitos a partir de frotis sanguíneos o aspirados de tejidos (como bazo, médula ósea, pulmón, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o nódulo linfático) permite un diagnóstico definitivo de la enfermedad (Neer & Harrus, 2006), sin embargo, y a pesar del desarrollo de técnicas destinadas a incrementar la posibilidad de identificar mórulas a partir de estas muestras (Huxsoll *et al.*, 1970; Mylonakis *et al.*, 2003), esta técnica resulta muy poco sensible, ya que las mórulas aparecen con mayor frecuencia en la fase aguda de la enfermedad y de forma transitoria, gracias a la presencia de un mayor número de leucocitos infectados en la sangre en esta fase (Hibler *et al.*, 1986; Woody & Hoskins, 1991). Se ha estimado que sólo se observan mórulas en un 4% de los frotis (Woody & Hoskins, 1991). A esto hay que añadir el hecho de que es necesario personal entrenado y calificado para la detección de las mórulas sin confundirlas con artefactos, tinciones mal realizadas u otras inclusiones (Mylonakis *et al.*, 2003).

Otro posible método de diagnóstico directo de la infección por *E. canis* sería el cultivo de este agente a partir de muestras del animal sospechoso en líneas celulares susceptibles de ser infectadas por este agente, como la línea celular macrofágica canina DH82. Sin embargo, este método es laborioso y requiere mucho tiempo, por lo que queda prácticamente relegado a labores de investigación (Harrus & Waner, 2010). Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR y la posterior secuenciación del material amplificado, son métodos sensibles y específicos para la detección y caracterización de estas infecciones (Harrus & Waner, 2010). Se ha

descrito la detección de DNA de *E. canis* a los 4-10 días post-infección (Iqbal & Rikihisa, 1994b), en ocasiones antes de que se puedan detectar anticuerpos en sangre. Esta técnica puede ayudar, además, a confirmar la eliminación del microorganismo tras el tratamiento, ya que detecta el ADN del mismo y, por tanto, la existencia de infección activa. Esto permite diferenciar entre aquellos perros que han sido tratados pero permanecen infectados de aquellos que tras el tratamiento han eliminado a *E. canis* pero mantienen títulos de anticuerpos elevados (Harrus *et al.*, 1998b).

Sin embargo, esta técnica posee algunos inconvenientes que deben ser tenidos en cuenta a la hora de su empleo como método de diagnóstico, entre los que se encuentran su elevado costo, la falta de estandarización entre laboratorios o la aparición de resultados falsos positivos o falsos negativos. Esto hace que sea recomendable emplear la reacción en cadena de polimerasa PCR siempre en combinación con la serología para el diagnóstico de la EMC (Neer *et al.*, 2002).

2.1.8.2. MÉTODOS INDIRECTOS DE DIAGNÓSTICO DE LA EMC

Una alternativa a los métodos diagnósticos que permiten una detección directa de *E. canis* son los métodos indirectos, que permiten determinar la presencia del agente infeccioso mediante la valoración de la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador. En general, con estos métodos indirectos se valora la respuesta inmunitaria de tipo humoral que se desencadena. De hecho, la detección de los anticuerpos generados mediante técnicas serológicas es una de los métodos más comúnmente empleados para el diagnóstico de la EMC (Harrus & Waner, 2010), pudiendo emplearse tanto la inmunofluorescencia indirecta (IFI) como el *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) o el inmunoblot (Ristic *et al.*, 1972; Waner *et al.*, 2000b; Waner *et al.*, 2001; Harrus & Waner, 2010).

La IFI para la detección de anticuerpos IgG anti-*E. canis* fue desarrollada en 1972 por Ristic y colaboradores, presenta una alta sensibilidad y especificidad y es considerada la técnica serológica “*gold - standard*” o de referencia para el diagnóstico de la EMC (Ristic *et al.*, 1972; Waner *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2002; Harrus & Waner, 2010). Las IgM no se consideran un indicador fiable de la exposición a *E. canis*, debido a la elevada variabilidad de los anticuerpos IgM en esta infección (McBride *et al.*, 2003). Para realizarla, por lo general se emplean como antígeno cultivos celulares infectados por *E. canis*, que se fijan en porta especial para inmunofluorescencia al que se enfrentarán diluciones seriadas de la muestra sérica del perro sospechoso (Ristic *et al.*, 1972).

Al emplear esta técnica como método diagnóstico se debe tener en cuenta que un resultado serológico positivo en una muestra de un perro que vive en una zona endémica de EMC sólo confirma la exposición al patógeno, pero no confirma que los síntomas observados en el animal sean necesariamente causados por *E. canis*, ya que los anticuerpos pueden mantenerse elevados incluso después de haber eliminado la infección o durante la fase subclínica (Neer & Harrus, 2006). No obstante, un título de anticuerpos positivo junto con signos clínicos, pudiendo implicar o no, alteraciones en las pruebas de laboratorio compatibles con EMC es considerado diagnóstico (Neer *et al.*, 2002). De la misma forma, un resultado negativo no siempre permite descartar la infección por *E. canis*, ya que aquellos animales que se encuentran en una fase muy avanzada y grave de la enfermedad o los animales moribundos pueden ser incapaces de desarrollar anticuerpos (Waner *et al.*, 2001). Además, esta técnica permite detectar anticuerpos de forma tan temprana como a los 3 días postinfección, pero muchos perros no serán seropositivos hasta 28 días después de infectarse (Iqbal *et al.*, 1994a; Neer & Harrus, 2006). Por lo tanto, en los casos clínicamente sospechosos de EMC que dan un resultado serológico negativo se recomienda repetir la prueba a las 2-3 semanas en busca de seroconversión (Neer *et al.*, 2002; Neer & Harrus, 2006; Harrus & Waner 2010). El diagnóstico serológico de la EMC se complica por la existencia de reacciones cruzadas entre *E. canis* y otras especies de la familia Anaplasmataceae (Neer & Harrus 2006; Harrus & Waner, 2010).

E. canis no presenta reacción cruzada con *A. platys*, pero sí con *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii*, *N. helminthoeca*, *N. risticii* y, en menor medida que con las anteriores, con *A. phagocytophilum* (Waner *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2002; Neer & Harrus, 2006; Harrus & Waner 2010).

Ante un resultado serológico positivo se debería valorar la posible exposición a estas especies bacterianas teniendo en cuenta el área geográfica de residencia del perro y su historial de viajes, ya que de las especies mencionadas, solamente se ha descrito la presencia de *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *A. Platys* en España (Sainz *et al.*, 1999; Sainz *et al.*, 2000a; Neer *et al.*, 2002; Neer & Harrus, 2006; Amusatogui *et al.*, 2008; Harrus & Waner, 2010).

En cualquier caso, desde un punto de vista clínico, estos agentes se comportan de modo parecido y su abordaje clínico y terapéutico es similar.

Además de la IFI, se han desarrollado técnicas ELISA para el diagnóstico de la EMC que han permitido poner al alcance de los clínicos veterinarios métodos diagnósticos que pueden realizarse sin necesidad de equipo especial ni personal calificado (Waner *et al.*, 2000b, Harrus &

Waner, 2010). El ELISA aplicado al diagnóstico de la infección por *E. canis* sirve para la detección de anticuerpos IgG frente a este agente (Waner *et al.*, 2000b). Algunos autores consideran que existe una baja correlación entre los resultados obtenidos entre los ELISAs comercialmente disponibles, el Western blot y la IFI a títulos de anticuerpos bajos, lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de su utilización (O'Connor *et al.*, 2006).

El inmunoblot o Western immunoblot es una técnica serológica más específica que puede servir de ayuda a la hora de caracterizar el agente implicado en la infección, sobre todo si existen dudas derivadas de las posibles reacciones cruzadas ya descritas (Rikihisa *et al.*, 1994; Harrus & Waner, 2010).

2.2. TRATAMIENTO DE LA EMC

Incluye, por una parte, un tratamiento farmacológico específico que permita eliminar al agente causal de la enfermedad y, por otra parte, una terapia de apoyo sintomático que favorezca la recuperación del animal afectado (Neer & Harrus, 2006).

Entre los fármacos eficaces frente a estos agentes destacan las tetraciclinas, el dipropionato de imidocarb, la amicarbacida y el cloranfenicol (Neer & Harrus, 2006). Se recomienda comenzar el tratamiento lo más pronto posible, ya que muchas de las complicaciones o alteraciones que se producen en el curso de la fase crónica de la EMC hacen que sea más complicada la recuperación del animal (Woody & Hoskins, 1991; Mylonakis *et al.*, 2004).

Dentro del grupo de las tetraciclinas, la tetraciclina y la oxitetraciclina fueron empleadas para el tratamiento de las ehrlichiosis y aún se describe una buena actividad antirickettsial para estas sustancias. Sin embargo, las tetraciclinas semisintética doxiciclina y minociclina son en la actualidad las drogas de elección en el tratamiento de la EMC (Breitschwerdt *et al.*, 1998a; Sainz *et al.*, 2000b; Neer *et al.*, 2002; Neer & Harrus, 2006) debido a su mayor liposolubilidad, excelente absorción y una menor nefrotoxicidad.

El hecho de que posean una mayor liposolubilidad hace que su penetración en las células sea mayor, lo que favorece que estas sustancias sean más eficaces en la lucha frente a *E. canis*, bacteria intracelular obligada. La administración de estas sustancias se realiza por vía oral, aunque la doxiciclina puede ser administrada también por vía intravenosa.

La duración del tratamiento parece ser más importante que la dosis o la frecuencia de administración de las tetraciclinas (Woody & Hoskins, 1991), sin embargo, por el momento no se ha fijado una duración del tratamiento que garantice la eliminación completa del agente, aunque se ha recomendado la administración de doxiciclina a dosis de 10 mg/kg cada 24 horas durante 28 días (Neer *et al.*, 2002).

Tratamientos de menor duración han resultado en algunas ocasiones insuficientes en la eliminación de *E. canis* (Iqbal & Rikihisa, 1994b; Schaefer *et al.*, 2007), mientras que el empleo de la doxiciclina durante los 28 días recomendados ha mostrado ser eficaz en la eliminación de este agente en diferentes estudios (Breitschwerdt *et al.*, 1998b; Eddlestone *et al.*, 2007). No obstante, Harrus y colaboradores en 1998 describieron la persistencia de *E. canis* tras un tratamiento con doxiciclina de 6 semanas de duración en un perro que se encontraba en la fase subclínica de la EMC (Harrus *et al.*, 1998b).

Generalmente, después de 24-48 horas del comienzo de la administración de doxiciclina se observa una marcada mejoría clínica en los perros que se encontraban en la fase aguda o en la fase crónica leve de la enfermedad (Neer & Harrus, 2006). Los principales efectos adversos de la administración de tetraciclinas son alteraciones gastrointestinales, pudiendo causar vómitos tras su administración por vía oral. Asimismo estas sustancias pueden causar decoloración de los dientes en desarrollo y puede afectar a la funcionalidad renal y/o hepática. Sin embargo, la doxiciclina es el miembro más seguro de las tetraciclinas, ya que se excreta en forma de conjugado inactivo con las heces, con lo que disminuye sus efectos negativos sobre el tracto intestinal y puede ser administrada en animales con insuficiencia renal. Además, si se administra con alimento pueden evitarse en la mayoría de los casos las náuseas y los vómitos (Riviere & Spoo, 2001).

El dipropionato de imidocarb puede ser una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de la EMC. Su administración se lleva a cabo por vía intramuscular o subcutánea, a dosis de 5-7 mg/kg en dos inyecciones separadas por 15 días (Matthewman *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 2000b).

Se trata de un fármaco de carácter ácido, por lo que puede producir dolor en el punto de inoculación y, en ocasiones, provoca efectos anticolinesterasas como salivación, disnea, taquicardia, temblores o diarrea (Woody & Hoskins, 1991), que pueden revertirse mediante el empleo de atropina o glicopirrolato (Cohn, 2003). Un estudio publicado en 1980 muestra un mayor efecto terapéutico del dipropionato de imidocarb en comparación con la tetraciclina administrada durante dos semanas (Price & Dolan, 1980), pero estudios posteriores empleando doxiciclina y

Dipropionato de imidocarb de forma conjunta han mostrado que no existen diferencias significativas en las respuestas clínicas entre los perros tratados con ambas drogas o con una sola de ellas por separado, retrasándose, sin embargo, la recuperación a los valores normales de los recuentos plaquetarios y proteinogramas en los perros a los que se les administró dipropionato de imidocarb (Sainz *et al.*, 2000b).

En la misma línea, recientemente se ha constatado que el dipropionato de imidocarb no es capaz de eliminar *E. canis* en perros experimentalmente infectados por este agente (Eddlestone *et al.*, 2006).

La amicarbalida es una diamidina aromática empleada en el tratamiento de las babesiosis que ha sido utilizada también en el tratamiento de las ehrlichiosis, aunque los estudios llevados a cabo sobre su eficacia en estas enfermedades son escasos. Se emplea a dosis de 5-6 mg/kg, por vía intramuscular en dos inyecciones separadas por un intervalo de 15 días (Neer & Harrus, 2006).

El cloranfenicol es otro de los fármacos que pueden ser empleados en el tratamiento de la EMC y ha sido recomendado para el tratamiento de cachorros menores de 5 meses para evitar la decoloración de los dientes en erupción que causan los fármacos de la familia de las tetraciclinas (Neer & Harrus, 2006).

Sin embargo, debido a los riesgos sobre la salud pública derivados del uso del cloranfenicol ya que posee un efecto depresor de la médula ósea, a lo que se une el hecho de que existen mejores alternativas (principalmente, doxiciclina y dipropionato de imidocarb), este fármaco no suele emplearse en la práctica clínica para el tratamiento de la EMC (Neer & Harrus, 2006).

Otra alternativa descrita para el tratamiento de la EMC la constituyen las quinolonas, que poseen cierta actividad antirickettsial. Entre ellas, la enrofloxacin se ha visto que es eficaz en el tratamiento de la infección por *R. rickettsii* en perros, por lo que algunos autores sugieren que podría ser eficaz en el tratamiento de la infección causada por *E. canis* (Greene & Breitschwerdt, 2006). Sin embargo, en la infección experimental parece que no es capaz de eliminar a este agente (Neer *et al.*, 1999).

Aunque no existen estudios sobre su eficacia, se han descrito otras posibilidades en el tratamiento de la EMC, como son: eritromicina, macrólidos, rifampicina, penicilina y aminoglicósidos, entre otros (Neer & Harrus, 2006).

Como terapia de apoyo, en ocasiones puede ser necesario emplear fluidoterapia o, incluso, llevar a cabo transfusiones de sangre completa (en casos de anemia opancitopenia) o de plasma rico en plaquetas (en casos de trombocitopenia marcada) (Huxsoll *et al.*, 1970; Neer & Harrus, 2006).

También se ha descrito el empleo de glucocorticoides durante 2-7 días para atenuar los efectos inmunomediados relacionados con la infección, como son la trombocitopenia, la poliartritis, la vasculitis y meningitis (Frank & Breitschwerdt, 1999; Neer, Harrus, 2006).

Tras el tratamiento de los perros diagnosticados de EMC que se encuentran en la fase aguda, subclínica o crónica leve, la respuesta clínica suele ser muy buena y se evidencia a las 24-48 horas, mejorando el apetito, actividad del animal y demás sintomatología (Frank & Breitschwerdt, 1999; Sainz *et al.*, 2000b; Neer & Harrus, 2006), aunque en ocasiones la respuesta puede ser más lenta (Frank & Breitschwerdt, 1999).

La normalización de las alteraciones de la analítica sanguínea suele ser más progresiva. La resolución de la trombocitopenia se suele producir en un período de 7 a 10 días tras el inicio del tratamiento y es recomendable monitorizar el valor plaquetario para evaluar la eficacia de la terapia instaurada (Neer & Harrus, 2006). En cuanto a las alteraciones del proteinograma, los valores de la albúmina y de las globulinas se suelen normalizar en 3-9 meses, aunque pueden tardar hasta 12 meses en hacerlo (Neer & Harrus, 2006). El título de anticuerpos específicos frente a *Ehrlichia* spp. disminuye progresivamente tras el tratamiento eficaz y generalmente se negativiza a los 6-9 meses (Neer *et al.*, 2002), aunque algunos animales, a pesar de mejorar clínicamente, mantienen títulos elevados durante años, lo que puede indicar la permanencia del agente en el organismo, una producción de anticuerpos persistente, una nueva infección por *E. canis* o, simplemente, una respuesta inmunitaria residual indicativa de una infección pasada (Woody & Hoskins, 1991; Frank & Breitschwerdt, 1999; Neer *et al.*, 2002). Además, se ha observado que cuando el título de anticuerpos de partida al comenzar el tratamiento es muy elevado, el tiempo necesario para su normalización o negativización es mayor que cuando se parte de un título bajo (Greene, 1995; Sainz *et al.*, 2000b). En ocasiones, el hecho de que los anticuerpos frente a *E. canis* permanezcan durante períodos de tiempo tan prolongados hace que sea difícil establecer si el agente ha sido realmente eliminado del hospedador, por lo que puede ser aconsejable la realización de la PCR en combinación con la serología para garantizar que el tratamiento ha sido eficaz (Neer *et al.*, 2002).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta técnica no va a distinguir entre los microorganismos vivos y los muertos y que si *E. canis* permanece secuestrado en algún órgano, como el bazo, el resultado de la PCR a partir de una muestra de sangre periférica será negativo, a pesar de la persistencia del agente (Neer *et al.*, 2002).

Por otra parte, si un animal no muestra mejoría clínica y/o resolución de las alteraciones analíticas tras 1-2 semanas del comienzo del tratamiento, debe considerarse la posibilidad de que existan otras patologías concurrentes o que la causa de la sintomatología no sea la infección por *E. canis* (Cohn, 2003; Neer, Harrus, 2006).

En general se considera que el pronóstico de la EMC tras el tratamiento será favorable en las fases aguda, subclínica o crónica leve (Woody & Hoskins, 1991), mientras que en la fase crónica grave, que puede asociarse con el desarrollo de insuficiencia renal o aplasia de médula ósea, entre otros desórdenes, será desfavorable (Woody & Hoskins, 1991; Frank & Breitschwerdt, 1999; Mylonakis *et al.*, 2004).

2.3. PREVENCIÓN DE LA EMC

Desafortunadamente no existe por el momento una vacuna que permita proteger a los perros frente a la infección por *E. canis* (Neer & Harrus, 2006). Por lo tanto, la prevención de esta enfermedad se centra en el control de los vectores. A ello debe unirse el diagnóstico precoz de los animales enfermos y la aplicación de un tratamiento farmacológico adecuado (Neer & Harrus, 2006). Se ha descrito la posibilidad de administrar doxiciclina de modo preventivo a perros que puedan estar expuestos a la EMC (Davoust *et al.* 2005), pero este empleo de las tetraciclinas puede llevar al desarrollo de resistencias microbianas (Neer & Harrus 2006).

En las áreas endémicas debe mantenerse un control estricto de las garrapatas, principalmente mediante el empleo de antiparasitarios externos, entre los que destacan por su eficacia, entre otros, los collares de amitraz, el fipronil y la asociación de imidacloprid con permetrina (10% y 50%, respectivamente) (Davoust *et al.*, 2003; Estrada-Peña & Reme, 2005; Otranto *et al.*, 2008; Otranto *et al.*, 2010). Podrían emplearse, asimismo, antiparasitarios ambientales (Woody & Hoskins, 1991).

Por otra parte, debe evitarse el acceso de los perros a las zonas infestadas por garrapatas e inspeccionar al animal para detectarlas y eliminarlas, sobre todo después de sus paseos,

disminuyendo así la probabilidad de transmisión de *E. canis* y otros agentes (Neer *et al.*, 2002). Todos los animales que sean introducidos en una colectividad deberían ser analizados serológicamente para la detección de estas infecciones, protegidos frente a las garrapatas y aislados hasta que se tenga los resultados de las analíticas, para evitar de este modo introducir portadores en la colectividad (Woody & Hoskins, 1991).

Debido a la posibilidad de transmisión yatrogénica de la EMC mediante transfusiones sanguíneas, sería recomendable descartar la infección de los perros donantes (Woody & Hoskins, 1991).

2.4. INMUNOPATOGENIA Y RESPUESTA INMUNITARIA EN LA EMC

Como se ha descrito previamente, la EMC es una enfermedad causada por *E. canis*, bacteria gramnegativa intracelular obligada que es capaz de inducir en el perro una enfermedad potencialmente mortal (Harrus *et al.*, 1999). A pesar de que la primera descripción de ehrlichiosis canina se remonta a 1935 (Donatien & Lestoquard, 1935), hoy en día todavía no han sido bien definidos ni los mecanismos inmunitarios protectores desarrollados por el hospedador ni la patogenia de la enfermedad en la infección por *E. canis* (Mavromatis *et al.*, 2006; Unver *et al.*, 2006). Sin embargo, los ensayos *in vitro* y el desarrollo de modelos murinos *in vivo* empleando otras especies de *Ehrlichia* altamente relacionadas, así como los estudios llevados a cabo en infecciones naturales por *Ehrlichia* spp. en el hombre y otros animales, han permitido progresar significativamente en la comprensión actual de los mecanismos de la inmunidad e inmunopatogenia de la ehrlichiosis (Feng & Walker, 2004; Walker *et al.*, 2004; Chapes & Ganta, 2008).

2.4.1. Evasión Inmunitaria

La capacidad de supervivencia y patogenicidad de cualquier microorganismo en el hospedador va a depender de forma directa de su habilidad para evitar o resistir los mecanismos efectores de la inmunidad (Abbas *et al.*, 2008a). Las bacterias intracelulares obligadas, entre ellas las pertenecientes al género *Ehrlichia*, han desarrollado diferentes estrategias que les permiten asegurar no sólo su supervivencia, sino también su capacidad de replicación en el interior de los fagocitos (Abbas *et al.*, 2008a). Generalmente esta supervivencia en el interior de las células del hospedador es considerada por sí misma como uno de los principales mecanismos empleados en la evasión inmunitaria, ya que estas bacterias encuentran de este modo un lugar inaccesible para los

anticuerpos circulantes, por lo que su erradicación requerirá la participación de la inmunidad celular (Abbas *et al.*, 2008a), sin embargo, esta estrategia evasiva ha llevado a la necesidad del desarrollo por parte de *Ehrlichia* spp. de otra serie de mecanismos para eludir o inhibir las respuestas defensivas desencadenadas en los fagocitos, potentes células efectoras de la inmunidad innata (Barnewall *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004). Por lo tanto, la interacción entre *Ehrlichia* spp. y las células del hospedador resulta ser mucho más compleja que la simple satisfacción de las necesidades metabólicas de la bacteria (Zhang *et al.*, 2004); diversos estudios llevados a cabo en los últimos años han mostrado efectos de los agentes rickettsiales sobre el sistema inmunitario innato del hospedador que les permiten evadir las respuestas defensivas (van Heeckeren *et al.*, 1993; Lee & Rikihisa, 1996; Barnewall *et al.*, 1997; Vachieri *et al.*, 1998; Reddy & Streck, 1999; Mott *et al.*, 1999; Mott & Rikihisa, 2000; Harrus *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Lin & Rikihisa, 2004). Así, se ha observado que *E. chaffeensis*, especie ehrlichial con tropismo por los monocitos macrófagos y responsable de la ehrlichiosis monocítica humana (Dawson *et al.*, 1991), es capaz de afectar a las respuestas defensivas tempranas que se desarrollan en el hospedador al actuar sobre los receptores patogénicos innatos presentes en las células del sistema mononuclear fagocitario y en las vías de señalización que son activadas tras la estimulación de dichos receptores (Lin & Rikihisa, 2004).

Estos hallazgos son el resultado de los estudios experimentales desarrollados por Lin y Rikihisa en una línea celular monocítica humana infectada por *E. chaffeensis* que mostraron una disminución en la expresión de ciertos receptores de reconocimientos de patrones (PRRs), en concreto receptor tipo Toll-2 (TLR-2), receptor tipo Toll-4 (TLR-4) y grupo de diferenciación 14 (CD14), así como de varios factores de transcripción, como PU.1 y NF- κ B, probablemente a través de su inhibición de la ruta de transducción de señales *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Lin & Rikihisa, 2004). Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo de evasión inmunitaria a través del cual *E. chaffeensis* es capaz de sobrevivir en el interior de las células del hospedador mediante la inhibición de ciertas vías de señalización responsables de la activación de funciones bactericidas asociadas a la estimulación de los PRRs de los monocitos humanos (Lin & Rikihisa, 2004).

Generalmente los monocitos y los macrófagos son capaces de destruir a los microorganismos invasores mediante la fusión de los endosomas que contienen las bacterias con ciertos gránulos que contienen péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas (Abbas *et al.*, 2008b). Sin embargo, la supervivencia en el interior del fagocito de ciertas bacterias intracelulares, entre las que se encuentran *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum*, va a depender precisamente de su

habilidad para inhibir la fusión del fagosoma con los lisosomas (Barnewall *et al.*, 1997; Mott *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2008a; Tizard, 2009a).

Así, se ha observado, por ejemplo, que, tras la ingestión por el macrófago, *E. chaffeensis* evita la maduración del endosoma donde reside, impidiendo la expresión de marcadores lisosomales en su superficie y, por tanto, evitando su destrucción por las enzimas contenidas en dichos lisosomas (Mott *et al.*, 1999). Otro de los mecanismos más comúnmente empleados por los macrófagos y neutrófilos para la destrucción de los microorganismos es la generación de especies reactivas de oxígeno (Tizard, 2009c), frente a las que *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* son muy sensibles (Barnewall & Rikihisa. 1994).

Por lo tanto, estas bacterias han precisado desarrollar mecanismos que eviten la generación de estas especies reactivas de oxígeno, lo que han logrado mediante la inhibición de la actividad de la NADPH-oxidasa, principal sistema enzimático responsable de la generación de estas especies reactivas (Mott & Rikihisa. 2000).

La infección por *Ehrlichia* spp. es capaz de actuar a nivel transcripcional sobre un amplio rango de genes del hospedador, lo que, por una parte, favorece la evasión de las respuestas inmunitarias de forma directa, al actuar sobre la síntesis de citocinas o la inhibición de la apoptosis de la célula infectada, y, por otra parte, induce cambios en la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en procesos celulares como la biosíntesis y metabolismo, la expresión de canales de transporte iónico y la regulación de la diferenciación celular (Lee & Rikihisa. 1996; Zhang *et al.*, 2004). Así, se ha observado que la infección por *E. chaffeensis* en una línea monocítica humana altera significativamente los niveles transcripcionales del 4,5% de los genes del hospedador (Zhang *et al.*, 2004). Entre los efectos que se desencadenan en la célula hospedadora cabe destacar el hecho de que se impide la estimulación de la transcripción de ciertas citocinas, como son la interleucina-12 (IL-12), IL-15 y la IL-18, implicadas en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas tempranas y las respuestas inmunitarias mediadas por células que se desarrollan frente a microorganismos intracelulares. Esta represión puede ayudar a *E. chaffeensis* a evadir las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, ya que la secreción de dichas citocinas daría como resultado la estimulación de las células natural killer (NK) y linfocito T colaborador (Th1) para la producción de Interferón- γ (IFN- γ), que activaría a su vez a los macrófagos para destruir a las bacterias fagocitadas (Zhang *et al.*, 2004).

Del mismo modo y de forma relacionada, otros estudios han mostrado una inhibición de la síntesis del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-6 y GM-CSF (de sus siglas en inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y, en cambio, la expresión de bajos niveles de IL-1 β , IL-8 e IL-10 en monocitos humanos infectados por *E. chaffeensis* (Lee & Rikihisa, 1996), así como una supresión en la síntesis de citocinas inmunoestimuladoras y proinflamatorias y prostaglandinas en macrófagos de ratón infectados por otro agente de la familia Anaplasmataceae, *Neorickettsia risticii*, en respuesta al lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (van Heeckeren *et al.*, 1993).

Por otra parte, el efecto de *E. chaffeensis* a nivel transcripcional se refleja también en un incremento en la supervivencia de las células infectadas, ya que esta bacteria parece inducir la producción de ciertos inhibidores de la apoptosis (Zhang *et al.*, 2004), al igual que se ha observado para *A. phagocytophilum* en neutrófilos humanos (Yoshiie *et al.*, 2000). La apoptosis es uno de los mecanismos innatos de defensa del hospedador, por lo que esta inhibición supone una forma más que emplean los agentes intracelulares obligados para evadir las respuestas inmunitarias, al prevenir la destrucción de las bacterias que han sido internalizadas y evitar la muerte de estas células que han sido infectadas, con lo que la bacteria dispone de suficiente tiempo para replicarse en el interior de la célula del hospedador (Zhang *et al.*, 2004).

Hasta el momento nos hemos centrado en los efectos que sobre el sistema inmunitario innato ejercen para evitar su destrucción por el hospedador ciertos agentes rickettsiales relacionados estrechamente con *E. canis*. Sin embargo, es importante recalcar que, en la evasión de las respuestas defensivas, estos microorganismos actúan también sobre los mecanismos efectores de la inmunidad adaptativa, no sólo por medio de una inhibición de la secreción de citocinas reguladoras de las respuestas inmunitarias, como ya se ha descrito, sino también por medio de otros mecanismos más específicos. Como veremos más adelante, estudios llevados a cabo en relación con la respuesta inmunitaria protectora frente a organismos ehrlichiales indican que el componente predominante de estas defensas parece ser una respuesta de tipo Th1, caracterizada por la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-2, que conduce al desarrollo de una respuesta de base celular (Akkoyunlu & Fikrig 2000; Bitsaktsis *et al.*, 2004).

Sin embargo, ciertos agentes ehrlichiales, como *E. Ruminantium* y *E. canis*, parecen haber desarrollado un mecanismo de evasión inmunitaria consistente en una inhibición de esta respuesta de base celular mediante la disminución de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II) (Vachieri *et al.*, 1998; Harrus *et al.*, 2003) e, incluso, de

las de clase I (Vachery *et al.*, 1998) en sus células diana, con lo que la presentación antigénica a los linfocitos T estaría comprometida (Vachery *et al.*, 1998; Harrus *et al.*, 2003).

Sin embargo, algunos autores sugieren que *E. muris*, otra especie bacteriana genéticamente relacionada con *E. canis* y cuyas células diana son también los monocitos macrófagos, no evade la respuesta inmunitaria mediante la inhibición de la presentación antigénica por parte de las moléculas del CMH de clase II, sino que parece que lo logran por medio de la supresión de las señales de las células T activadas (Nandi *et al.*, 2009). Por otra parte, los datos moleculares obtenidos por Reddy y Streck en 1999 muestran otro posible mecanismo de evasión inmunitaria en el caso de *E. chaffeensis*. La existencia de variabilidad en algunos de sus genes, en concreto en algunas proteínas antigénicas de superficie, puede dificultar el reconocimiento antigénico y, por tanto, la puesta en funcionamiento de respuestas inmunitarias adaptativas por parte del hospedador (Reddy & Streck, 1999).

Todos estos mecanismos evasivos son los que van a conducir a que los agentes rickettsiales provoquen en el hospedador infecciones crónicas que pueden durar años, con recidivas y reactivaciones tras una curación aparente, que son difíciles de erradicar (Abbaset *et al.*, 2008a) y que les permiten establecer un estado de portador persistente (Waner *et al.*, 2001).

2.4.2. Respuesta inmunitaria frente a *Ehrlichia* spp.

A pesar del desarrollo por parte de *Ehrlichia* spp. De las citadas estrategias para evitar ser destruidas por el hospedador, éstas no resultan totalmente eficaces y se desarrolla por parte del sistema inmunitario del animal afectado una serie de respuestas en las que están implicados tanto el sistema inmunitario innato como el adaptativo y en las que participan tanto la rama celular como la humoral. La infección por *Ehrlichia* spp. se produce tras la picadura de la garrapata. Dicha picadura es la responsable del desarrollo de una inflamación inicial y de la liberación de mediadores químicos que atraen al foco de inflamación a las células del sistema inmunitario innato, lo que va a favorecer la infección por *Ehrlichia* spp., ya que así se logra aumentar en el punto de inoculación el número de células diana (neutrófilos o monocitos-macrófagos, según la especie ehrlichial implicada) (Rikihisa, 1991).

De forma general, la inmunidad innata frente a bacterias intracelulares se inicia tras el reconocimiento de componentes bacterianos por parte de los TLR y otros PRRs, lo que desencadena una cascada enzimática que conduce hacia la estimulación de los componentes

celulares que forman parte de esta rama de la inmunidad, la liberación de citocinas, la activación del complemento y el desarrollo de la inflamación (Abbas *et al.*, 2008a, Tizard 2009a). Sin embargo, como se ha mencionado previamente, los agentes ehrlichiales parecen carecer de dos de los ligandos más importantes de los TLR, LPS y péptidoglicano (Lin & Rikihisa 2003, Mavromatis *et al.*, 2006), por lo que estas bacterias probablemente expresen otros PAMP diferentes que permitan iniciar las respuestas innatas. Así, Huang y colaboradores han demostrado recientemente en ensayos *in vitro* con cultivos celulares de *E. chaffeensis* la expresión de múltiples lipoproteínas (Huang *et al.*, 2008) que podrían estimular actividades microbicidas en los monocitos y macrófagos a través del receptor TLR2 (Rikihisa, 2010).

Sin embargo, entre los mecanismos evasivos de las respuestas defensivas de *E. chaffeensis* destaca su capacidad para disminuir la expresión de estos TLR en la superficie de monocitos y macrófagos infectados (Lin & Rikihisa, 2004), por lo que es probable que estas lipoproteínas de *E. chaffeensis* no sean capaces de estimular a las células ya infectadas, sino que actúen sobre los monocitos y macrófagos no infectados y sobre otros tipos celulares para hacerlos refractarios a la infección y promover en ellos el inicio de respuestas defensivas. Por otra parte, parece que estas lipoproteínas son necesarias para la infección de las células del hospedador por *E. chaffeensis* (Huang *et al.*, 2008). A pesar de que clásicamente se ha considerado que el receptor TLR4 está implicado en el reconocimiento innato del LPS de las bacterias gramnegativas, se ha observado en ensayos experimentales *in vivo* de infección por *E. chaffeensis* que los ratones con deficiencia de TLR4 muestran un retraso en la eliminación de la infección y una disminución en la síntesis de NO₂ e IL-6 por los macrófagos en comparación con los ratones *wild type* (Ganta *et al.*, 2002), por lo que se ha sugerido que *E. chaffeensis*, y probablemente otras especies ehrlichiales, contengan otros PAMP que interaccionen con este receptor (Bitsaktsis *et al.*, 2004; Chapes & Ganta, 2008). Una vez producida la estimulación de los receptores innatos se inicia una serie de respuestas para la destrucción de los agentes ehrlichiales, como la síntesis de citocinas, que van a estimular tanto a células del sistema inmunitario innato como del adaptativo. En general, la protección frente a bacterias intracelulares está mediada por macrófagos, que adquieren la capacidad para destruir a las bacterias unos 10 días después del inicio de la infección y cuya respuesta suele ser inespecífica (Abbas *et al.*, 2008a; Tizard 2009a). Generalmente esta respuesta implica mecanismos dependientes e independientes de oxígeno (Waner *et al.*, 2001), pero en el caso de la infección por *Ehrlichia* spp. no está claro el papel que desempeñan los mecanismos oxidativos en la eliminación de estas bacterias, habiéndose descrito tanto un efecto mínimo de este mecanismo efector de las respuestas innatas (Waner *et al.*, 2001) como un papel crítico de las especies reactivas de oxígeno dependientes de la NADPH oxidasa (Yager *et al.*, 2005).

A pesar de que las actividades de los macrófagos y probablemente de otras células del sistema inmunitario innato, como las células NK, contribuyen a la destrucción de *Ehrlichia* spp., no parece que por sí solas sean capaces de eliminar por completo al patógeno y requieren, por el contrario, de la participación de las respuestas inmunitarias adaptativas (Ganta *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2008a).

En este sentido, la principal respuesta inmunitaria adaptativa que se desarrolla frente a las bacterias intracelulares es la inmunidad mediada por linfocitos T (Akkoyunlu & Fikrig, 2000; Tizard, 2009a).

En el caso de las infecciones ehrlichiales, parece que el mecanismo predominante en la protección del hospedador está constituido por la inmunidad mediada por células T de tipo 1 y la secreción por parte de éstas de IFN- γ , que conducen hacia una respuesta inmunitaria de base celular (Waner *et al.*, 2001; Bitsaktsis *et al.*, 2004). También, recientemente se ha comenzado a describir un papel protector importante de los anticuerpos en estas infecciones, contrariamente a lo que se había asumido históricamente (Kaylor *et al.*, 1991; Winslow *et al.*, 2000; Yager *et al.*, 2005). Aún así, existen resultados muy variables con respecto a los mecanismos implicados en las respuestas inmunitarias adaptativas desencadenadas en la ehrlichiosis, por lo que, en ocasiones, el papel que desempeña cada tipo celular o cada citocina en concreto puede ser confuso. Estos resultados divergentes pueden deberse al empleo en los diferentes estudios de distintos hospedadores o especies ehrlichiales y pueden reflejar mecanismos biológicos diferentes (Waner *et al.*, 2001).

De forma general, se ha observado que el IFN- γ juega un papel importante en el control del grado de rickettsemia durante las fases tempranas de la infección por *A. Phagocytophilum* en ratones (Akkoyunlu & Fikrig, 2000; Martin *et al.*, 2001) y la respuesta que se induce en estos animales es predominantemente de tipo Th1, si bien en fases más avanzadas los mecanismos que se desencadenan parecen ser independientes de IFN- γ (Akkoyunlu & Fikrig, 2000).

En la infección experimental en ratón por el agente ehrlichial recientemente aislado de una garrapata *Ixodes ovatus* (conocido como *Ixodesovatus* ehrlichia, IOE), que, al igual que *E. canis*, posee tropismo por los monocitos y macrófagos, se observó un incremento en la susceptibilidad a la enfermedad fatal en aquellos animales deficientes para IL-12p40, IFN- γ , TNF- α o para los receptores de IFN- γ o de TNF- α , lo que demuestra la importancia de las citocinas de tipo 1 en la defensa del hospedador frente a las infecciones por estos agentes patógenos (Bitsaktsis *et al.*

2004). Entre los mecanismos a través de los cuales el IFN- γ es capaz de inducir la destrucción de los microorganismos intracelulares, destacan en el caso de las infecciones ehrlichiales principalmente dos. Diferentes modelos de infección rickettsial han mostrado que el IFN- γ en asociación con el TNF- α induce un mecanismo de destrucción rickettsial en los fagocitos mediado por NO que es crítico para la supervivencia del hospedador (Feng *et al.*, 1994).

El IFN- γ también puede efectuar la destrucción de *Ehrlichia* spp. en las células por el secuestro de arginina y/o por disminución de la expresión de receptores de superficie de transferrina y la consiguiente reducción en las reservas intracelulares de hierro (Park & Rikihisa, 1991, Barnewall & Rikihisa, 1994). Independientemente del mecanismo empleado por esta citocina para inducir la destrucción ehrlichial, es importante recalcar que su actuación se efectúa de forma sinérgica con el TNF- α , como fue descrito por Feng y Walker en 2004 en un modelo murino de infección por *E. muris* en el que se observó en los animales infectados un incremento en la mortalidad de hasta un 75% cuando se combinaban la neutralización de IFN- γ y de TNF- α en el mismo animal, mientras que los ratones con neutralización de una sola de las citocinas no mostraron una diferencia significativa en la mortalidad en comparación con los ratones en los que no se neutralizó ninguna (Feng & Walker, 2004). Ambas citocinas, IFN- γ y TNF- α , son dos de los principales mediadores de la inmunidad de tipo 1 y, por lo tanto, cabría esperar un papel decisivo para las células Th1 en la defensa del hospedador en la infección por estas rickettsias. En este sentido diversos estudios han mostrado la participación de estas células en la protección frente a *Ehrlichia* spp. de una forma similar a la descrita para otras infecciones por agentes intracelulares (Ganta *et al.*, 2002; Bitsaktsis *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2006; Ismail *et al.*, 2007). En el 2002, Ganta y colaboradores sugirieron que las moléculas del CMH de clase II eran esenciales en la eliminación de la infección por *E. chaffeensis* en el hospedador murino, lo que conduciría a que la completa supresión de este patógeno requeriría la presencia de células TCD4+ funcionales. Diferentes estudios han apoyado esta hipótesis, como, por ejemplo, los de Bitsaktsis y colaboradores en 2004 o los de Ismail y colaboradores en 2007.

Ambos trabajos describen un papel crítico para el correceptor CD4, y no para el correceptor CD8, en la defensa del hospedador en la infección experimental por IOE en ratones *knockout* (Bitsaktsis *et al.*, 2004; Ismail *et al.*, 2007).

Sin embargo, en este punto es importante recalcar que los estudios experimentales llevados a cabo en infecciones por agentes ehrlichiales en ratones *knockout* han mostrado en ocasiones algunos resultados que varían notablemente entre los diferentes ensayos. Así, y a pesar de lo

mencionado en el párrafo anterior, en base a los hallazgos de diferentes estudios, no todos los autores consultados opinan que las células T CD8+ ejerzan un mínimo papel en la defensa frente a la ehrlichiosis, sino que se ha descrito un papel esencial para estas células en las respuestas defensivas frente a *E. muris* (Feng & Walker, 2004).

Asimismo, Thirumalapura y colaboradores en 2008 describieron que, tras la infección persistente por *E. muris* en ratones, se logró obtener una protección cruzada frente a la infección posterior por IOE en los mismos animales, y dicha protección se asoció con la generación y mantenimiento de respuestas mediadas por células T de memoria tanto CD4+ como CD8+ específicas de *Ehrlichia* productoras de IFN- γ , así como con la producción de IgG séricas específicas de *Ehrlichia* (Thirumalapura *et al.*, 2008).

Sin embargo, de nuevo existe controversia en estos resultados, ya que otros estudios han dotado de importantes papeles a las células T CD8+ en la ehrlichiosis, pero no en la protección de los hospedadores, sino, por el contrario, en la inmunopatogenia relacionada con la enfermedad y, por lo tanto, en el daño ocasionado al hospedador por su propio sistema inmunitario (Ismail *et al.*, 2004; Bitsaktsis & Winslow, 2006; Ismail *et al.*, 2007). Por otra parte, estudios recientes de Bitsaktsis y colaboradores en 2007 cuestionaron el papel que ejercen las células T CD4+ y las células T CD8+, así como el de las citocinas de tipo 1, en el curso de la ehrlichiosis, al observar que ratones deficientes en células CD4+, CD8+ o moléculas del CMH de clase II desarrollaron una inmunidad protectora tras la infección por *E. muris* y permanecieron, por tanto, protegidos frente a la posterior infección con IOE del mismo modo que ocurría en los ratones normales (Bitsaktsis *et al.*, 2007).

La habilidad de los ratones para eliminar la bacteria o inducir respuesta protectora en ausencia de células T CD4+ sugiere que las células Th podrían no ser esenciales (Bitsaktsis *et al.* 2007). No obstante, la hipótesis de que una respuesta inmunitaria mediada por células es necesaria para la resistencia ehrlichial está apoyada también por la observación de la formación de granulomas en el hígado de los ratones infectados por *E. chaffeensis*, que actúa impidiendo la diseminación bacteriana (Ganta *et al.*, 2002).

Por otra parte, aunque por lo general se ha asumido que los anticuerpos no juegan ningún papel en la defensa del hospedador frente a las infecciones ehrlichiales, cada vez más datos apuntan a que esta afirmación es errónea (Kaylor *et al.*, 1991; Messick & Rikihisa, 1994, Lee & Rikihisa,

1997, Sun *et al.*, 1997, Casadevall, 1998; Winslow *et al.*, 2000; Feng & Walker, 2004; Yager *et al.*, 2005; Bitsaktsis *et al.*, 2007).

De hecho, los patógenos intracelulares para los que los anticuerpos no hayan mostrado algún tipo de protección parecen ser una minoría (Casadevall, 1998). En la infección por *E. canis* se desarrollan anticuerpos específicos IgM e IgA tras 4-7 días, mientras que las IgG, predominantemente IgG2 (Harrus *et al.*, 2001), comienzan a detectarse en la sangre de los perros infectados a los 15 días postinfección (Weisiger *et al.*, 1975), aunque la aparición inicial de estos anticuerpos puede depender de la dosis infectiva (Rikihisa *et al.*, 1992). En cuanto al papel de estos anticuerpos en la protección frente a la ehrlichiosis, éste aún no ha sido totalmente aclarado. Se ha observado que la transferencia de anticuerpos y/o suero inmune frente a diversas especies de la familia Anaplasmataceae, como *N. risticii*, *A. Phagocytophilum* y *E. chaffeensis*, permite dotar a los animales infectados de una inmunidad protectora sustancial transitoria, aunque no completa, y una disminución en la carga rickettsial (Kaylor *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1997; Winslow *et al.*, 2000).

Asimismo, los resultados de Feng y Walker presentados en 2004 han confirmado que la inmunidad protectora desarrollada en ratones frente al agente ehrlichial *E. muris* está mediada por una combinación tanto de respuestas celulares como de respuestas humorales, con la síntesis de anticuerpos específicos frente a antígenos de esta bacteria.

Por otra parte, es importante destacar que los linfocitos B parecen no limitarse a la síntesis de inmunoglobulinas, sino que también son capaces de ejercer otras funciones en la protección del hospedador en las infecciones ehrlichiales, como pueden ser la síntesis de citocinas que modulen la respuesta inflamatoria o la estimulación de la expansión y activación de las células T CD4+ (Yager *et al.*, 2005; Bitsaktsis *et al.*, 2007).

El modo en que los anticuerpos frente a *Ehrlichia* spp. pueden actuar en la eliminación de la infección son variables. Los agentes ehrlichiales van a requerir un paso por el espacio extracelular antes de penetrar en las células, por lo que, en este momento, las inmunoglobulinas pueden inducir la destrucción de los microorganismos por la vía clásica de deposición del complemento y/o por opsonización (Messick & Rikihisa, 1994; Winslow *et al.*, 2000). Además, pueden interferir con la infectividad celular, al contribuir a la neutralización de la bacteria e impedir su unión e internalización en la célula hospedadora (Messick & Rikihisa, 1994; Winslow *et al.*, 2000).

Una vez que la infección de la célula hospedadora se ha producido, los anticuerpos pueden actuar estimulando la citolisis de dicha célula (Winslow *et al.*, 2000) e, incluso, ejerciendo un efecto inhibitor de la replicación intracelular del agente y estimulando actividades bactericidas (Messick & Rikihisa, 1994).

Asimismo, se ha observado que los anticuerpos específicos frente a *E. Chaffeensis* y, más concretamente, los inmunocomplejos formados por la unión de las inmunoglobulinas con las bacterias, son responsables de la producción de citocinas proinflamatorias en los animales infectados, lo que puede causar un daño temporal en el hospedador pero que también contribuye a la puesta en funcionamiento de mecanismos antiehrlichiales mediante la activación de respuestas inmunitarias protectoras (Lee & Rikihisa, 1997).

Por lo tanto, los datos de estos estudios en conjunto muestran que los anticuerpos y los linfocitos B pueden jugar un papel significativo en la eliminación de estas bacterias intracelulares obligadas durante la infección activa, aunque la inmunidad celular es necesaria para la eliminación completa de la bacteria, por lo que se requiere la participación de forma organizada de todas las ramas de la inmunidad en la lucha frente a estos agentes intracelulares obligados (Winslow *et al.*, 2000).

Sin embargo, el papel que desempeñan los anticuerpos en la infección por *E. canis* en concreto está menos claro. Así, los resultados obtenidos por Hess y colaboradores parecen indicar que los anticuerpos generados en la infección por *E. canis* en el perro no juegan un papel importante en la eliminación del agente, al no haberse observado diferencias en los títulos de anticuerpos entre los perros que fueron capaces de eliminar al agente del torrente sanguíneo y los que desarrollaron una infección persistente (Hess *et al.*, 2006).

Además, se ha observado que en perros infectados experimentalmente con *E. canis*, la persistencia de títulos de anticuerpos altos tras el tratamiento y eliminación del agente no mostró un valor protector cuando estos perros fueron inoculados con cepas de *E. canis* homólogas o heterólogas. Incluso, al reinfectar con cepas heterólogas a estos animales que mantenían títulos elevados, se desarrollaron cuadros más graves en comparación con el desafío con cepas homólogas (Breitschwerdt *et al.*, 1998a). En resumen y para facilitar la comprensión de la inmunidad desarrollada en el curso de la infección por *Ehrlichia* spp., los conocimientos actuales conducen a pensar que las células T CD4+ juegan un papel dominante en la inmunidad protectora a través de su producción de citocinas de tipo 1 y el desarrollo de una inmunidad mediada por células. En esta

inmunidad protectora participan, no obstante, otros componentes del sistema inmunitario, como las células TCD8+ y la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B.

2.4.3. Inmunopatogenia de la EMC

Aunque las respuestas inmunitarias desarrolladas frente a las agresiones suelen, y en principio deberían, ser beneficiosas, no siempre se consigue este objetivo, ya que pueden influir en el curso de las enfermedades sin lograr su curación e, incluso, pueden llegar a agravar el proceso (Tizard, 2009a).

De hecho, en muchas infecciones, la lesión y la sintomatología de la enfermedad pueden deberse a la respuesta del hospedador frente al microorganismo y a sus productos, más que al efecto del propio microorganismo (Abbas *et al.*, 2008a).

En el caso de la EMC parece que la respuesta inmunitaria desarrollada no sólo no es eficaz, sino que puede ser la causa directa tanto del cuadro clínico como de las lesiones generadas (Kakoma *et al.* 1978; Reardon & Pierce 1981b; Codner *et al.*, 1985; Harrus *et al.*, 1999).

La excesiva producción de anticuerpos junto con una respuesta celular disminuida parece influir decisivamente en la patogenia de la enfermedad (Reardon & Pierce, 1981a; Harrus *et al.*, 1999).

Algunos de los hallazgos que conducen a pensar que los mecanismos inmunitarios desarrollados por el hospedador en la EMC se encuentran directamente implicados en la patogenia de la enfermedad son la presencia de extensos infiltrados de células plasmáticas en órganos parenquimatosos y en la médula ósea, el desarrollo de hipergammaglobulinemia policlonal que no se correlaciona con los títulos de anticuerpos específicos frente a *E. canis* y la detección de anticuerpos antiplaquetarios y pruebas de autoaglutinación y de Coomb's positivas en los perros infectados experimentalmente (Reardon & Pierce, 1981a; Harrus *et al.*, 1996a; Harrus *et al.*, 1999; Neer & Harrus, 2006). Además, parece existir una disparidad entre el bajo número de microorganismos que se encuentran en la sangre y en los tejidos del hospedador en la infección por diferentes especies ehrlichiales y el número relativamente elevado de lesiones anatomopatológicas inducidas (Rikihisa, 1999; Lepidi *et al.*, 2000), especialmente en el hígado, donde se ha descrito la existencia de muerte celular en hepatocitos sin ninguna evidencia de infección ehrlichial (Lepidi *et al.*, 2000), lo que conduce a especular que la patogenia de estas enfermedades no está causada

directamente por el agente, sino que está mediada por el propio hospedador (Rikihisa, 1999; Lepidi *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001; Stevenson *et al.*, 2006).

Como se ha descrito previamente, algunos de los signos clínicos observados en la ehrlichiosis canina se relacionan con complicaciones de la enfermedad, entre las que destaca el daño renal, que parece ser inmunomediado (Cohn, 2003).

Durante la fase aguda de la enfermedad se ha documentado la presencia de una nefropatía perdedora de proteínas caracterizada por la presencia de infiltrados perivenulares e intersticiales de linfocitos y células plasmáticas localizados principalmente en la corteza renal y lesiones glomerulares mínimas debidas al depósito de inmunocomplejos, lo que sugiere la implicación de la respuesta inmunitaria del hospedador (Codner *et al.*, 1992a; Codner & Maslin, 1992b).

En la fase crónica de la ehrlichiosis monocítica canina se puede observar también la existencia de daño renal, aunque en este caso se asocia con el desarrollo de una glomerulonefritis con síndrome nefrótico (Frank & Breitschwerdt, 1999; Neer & Harrus 2006). Otros signos clínicos que se han asociado a menudo con la respuesta inmunitaria del hospedador más que con la acción directa del agente son los signos locomotores, debidos a polimiositis y a mono o poliartritis por hemartrosis o deposición de inmunocomplejos, aunque por lo general estos signos son más frecuentes en infecciones por especies granulocíticas, como *E. ewingii* o *A. phagocytophilum* (Neer & Harrus, 2006).

Por otra parte, varios de los signos clínicos más frecuentes en esta enfermedad, como son la fiebre, anorexia o depresión, pueden estar relacionados de forma directa con el incremento de las concentraciones séricas de ciertas citocinas, como IL-1, IL-8 o el TNF- α , que son inducidas en un intento de resolver la infección (Unver *et al.*, 2006, Tizard 2009b).

Se ha documentado que la secreción de ciertas citocinas en el curso de la infección por *Ehrlichia* spp. Puede contribuir al daño tisular inflamatorio (Lee & Rikihisa, 1996; Lee & Rikihisa 1997; Dumler *et al.*, 2000).

En el curso de la EMC la alteración hematológica más frecuentemente descrita es la trombocitopenia (Neer & Harrus, 2006).

Así, suele observarse la presencia de trombocitopenia, anemia y leucopenia moderadas durante la fase aguda de la enfermedad, trombocitopenia moderada durante la fase subclínica y pancitopenia durante la fase crónica grave (Harrus *et al.*, 1997).

Estas alteraciones hematológicas parecen ser una de las principales consecuencias negativas de la respuesta del hospedador frente a la infección por *E. canis*. Así, la trombocitopenia se puede atribuir a diferentes mecanismos en los diferentes estadios de la enfermedad, y dichos mecanismos pueden actuar solos o combinados entre sí (Waner *et al.*, 1995).

Se ha observado un incremento en el consumo de plaquetas debido a cambios inflamatorios en el endotelio vascular sanguíneo (Woody & Hoskins, 1991), así como un aumento en el secuestro esplénico de las plaquetas (Woody & Hoskins, 1991), que se producen principalmente durante la fase aguda de la enfermedad, aunque no se limitan a esta fase (Kakoma *et al.*, 1978).

También, se ha identificado un factor inhibidor de la migración plaquetaria que impide la formación de pseudópodos en estas células, que se redondean y tienden a agruparse, lo que puede interferir con la entrada de las plaquetas en el sistema circulatorio, con el consiguiente descenso de sus recuentos sanguíneos (Kakoma *et al.*, 1978).

Por otra parte, durante la ehrlichiosis monocítica canina se produce un incremento en la destrucción plaquetaria, principalmente en el bazo, lo que conduce a un considerable descenso en su vida media (Smith *et al.*, 1975). El hallazgo de la existencia de anticuerpos antiplaquetarios en el suero de perros con infección tanto experimental como natural por *E. canis* es indicativo de la existencia de un mecanismo de destrucción inmunológica de estas células (Waner *et al.*, 1995; Harrus *et al.*, 1996b; Grindem *et al.*, 1999).

Estos anticuerpos pueden participar también en las disfunciones plaquetarias observadas en el curso de la ehrlichiosis monocítica canina (Harrus *et al.*, 1996b).

Se han detectado IgG ligadas a plaquetas en perros infectados experimentalmente por *E. canis* de forma tan temprana como a los 3 días postinfección (Waner *et al.*, 2000a) y se ha documentado la existencia de anticuerpos antiplaquetarios en otras enfermedades infecciosas causadas por especies relacionadas, como, por ejemplo, por *Rickettsia rickettsii*, agente causal de la Fiebre de las Montañas Rocosas (Grindem *et al.*, 1999).

Asimismo, en medicina humana se ha descrito la presencia de anticuerpos antiplaquetarios en el 80% de las muestras séricas de pacientes con ehrlichiosis granulocítica humana (Wong & Thomas, 1998).

La existencia de anticuerpos antieritrocitarios parece participar de la misma forma en la anemia observada en la infección por *E. canis* (Frank & Breitschwerdt, 1999).

Durante la fase crónica de la ehrlichiosis monocítica canina se cree que el principal factor responsable de la trombocitopenia es un descenso en la síntesis de plaquetas debido a una hipoplasia de la médula ósea (Woody & Hoskins, 1991).

Dicha hipoplasia de la médula ósea parece ser la causante de la pancitopenia observada durante esta fase (Harrus *et al.*, 1999).

Por otra parte, recientemente se ha descrito en un modelo experimental de infección por *E. muris* en ratones la existencia de alteraciones en la actividad de las células progenitoras en la médula ósea, así como el desarrollo de una hematopoyesis extra medular (MacNamara *et al.*, 2009).

Estos hallazgos sugieren que las citopenias observadas en el curso de las ehrlichiosis monocíticas pueden ser el resultado de una funcionalidad inadecuada de las células progenitoras sanguíneas por estrés hematopoyético inducido por la infección, así como del secuestro de éstas por el bazo (MacNamara *et al.*, 2009).

Debido a la importancia del bazo en la patogenia de numerosas enfermedades, se llevó a cabo un estudio en el que se evaluó el papel que este órgano desempeña en la ehrlichiosis monocítica canina mediante la realización de una esplenectomía en perros experimentalmente infectados por *E. canis*, confirmándose la aparición de unos signos clínicos y hematológicos más leves en los perros esplenectomizados en comparación con los perros intactos (Harrus *et al.*, 1998c).

Estas diferencias sugieren que en esta enfermedad se encuentran implicados ciertos mecanismos inmunológicos y que el bazo juega un papel central en la patogenia de la ehrlichiosis canina, probablemente mediante la liberación de mediadores inflamatorios esplénicos responsables de los signos clínicos observados y mediante la producción de elevadas cantidades de anticuerpos,

ya que se trata de uno de los principales órganos productores de inmunoglobulinas (Harrus *et al.*, 1998c).

Por otra parte, se ha sugerido que *E. canis* es capaz de inducir en el perro un cierto grado de inmunosupresión, que se manifiesta principalmente con alteraciones en la inmunidad mediada por células (Greene 1995) y que podría ser responsable de la elevada frecuencia de concurrencias con otras patologías descrita en la ehrlichiosis canina (Frank & Breitschwerdt, 1999; Neer & Harrus, 2006).

Los resultados obtenidos en estudios experimentales de infección por *A. Phagocytophilum* en ovejas han demostrado un efecto inmunosupresor de este agente (Woldehiwet, 1987a; Woldehiwet, 1987b; Woldehiwet, 1991; Larsen *et al.*, 1994; Gokce & Woldehiwet, 1999; Whist *et al.*, 2003).

Las ovejas infectadas muestran una severa leucopenia debida a una linfocitopenia temprana, debida a un descenso tanto de los linfocitos T CD4+, T CD8+ y T $\gamma\delta$ como de los B (Woldehiwet, 1991; Whist *et al.*, 2003), y neutropenia y trombocitopenia prolongadas (Woldehiwet, 1987b).

Se ha observado que este agente predispone a los animales al padecimiento de infecciones bacterianas y víricas más graves (Larsen *et al.*, 1994) no sólo por la disminución en el número de células defensivas, sino también porque provoca alteraciones en las funciones de estas células (Woldehiwet, 1987a; Woldehiwet, 1987b; Larsen *et al.*, 1994).

La infección por *A. phagocytophilum* en ovejas se manifiesta tanto por una alteración en la respuesta humoral, con un descenso en la síntesis de anticuerpos en los animales infectados tras la inmunización con diferentes antígenos (Larsen *et al.*, 1994; Whist *et al.*, 2003) como por alteraciones en las respuestas inmunitarias celulares, con una reducida reactividad linfocitaria a la estimulación por mitógenos o antígenos (Woldehiwet, 1987a; Gokce & Woldehiwet, 1999; Whist *et al.*, 2003).

Además, aunque se ha descrito un descenso inicial en el número de linfocitos T CD8+, posteriormente se produce una proliferación de dicha subpoblación, llevando a una inversión del índice linfocitario CD4:CD8 (Whist *et al.*, 2003).

En medicina humana se ha observado que los pacientes afectados por ehrlichiosis aguda causada por *A. phagocytophilum* muestran una linfocitopenia predominantemente originada por apoptosis de los linfocitos T $\gamma\delta$ (Caldwell *et al.*, 1996).

La infección por *N. risticii* en ratones parece también provocar de forma dosis dependiente una disminución marcada y aguda en las respuestas proliferativas *in vitro* de las células esplénicas ante la estimulación por mitógenos, así como una disminución en la secreción de IL-2 (Rikihisa *et al.*, 1987).

También se ha descrito, en la infección por *E. chaffeensis*, un posible efecto inmunosupresor de algunas de las citocinas secretadas, como IL-10 (Lee & Rikihisa, 1996).

Dada la similitud existente entre estas especies y *E. canis*, es probable que en el curso de la ehrlichiosis monocítica canina puedan desarrollarse algunas de las anomalías inmunosupresoras descritas en otros animales o en el hombre. Así, se han observado alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y CD8+ en la sangre de perros con ehrlichiosis tras la infección natural, que conducen a una inversión del índice CD4:CD8 (Frank & Breitschwerdt, 1999; Heeb *et al.*, 2003; Lorente *et al.*, 2008).

Heeb y colaboradores en 2003 describieron el caso clínico de un perro con infección natural por *E. canis* que presentaba alteraciones marcadas en las subpoblaciones de linfocitos T, con predominancia de los linfocitos TCD8+ y un descenso en los linfocitos TCD4+, con lo que el ratio CD4:CD8 se encontraba invertido (Heeb *et al.*, 2003).

En este caso, se describía la presencia de otra alteración en el sistema inmunitario: se observó la existencia de una linfocitosis granular grande, que había sido descrita previamente en otros estudios de ehrlichiosis monocítica canina (Heeb *et al.*, 2003; Neer & Harrus, 2006).

A pesar de que estas alteraciones en las poblaciones linfocitarias en los perros infectados por *E. canis*, junto con la elevada frecuencia de concurrencias observadas en estos perros y las alteraciones inmunitarias descritas en otras especies animales con infecciones rickettsiales relacionadas podrían indicar la existencia de una inmunosupresión durante el curso de la ehrlichiosis monocítica canina, los conocimientos existentes por el momento no permiten confirmar esta hipótesis. De hecho, Hess y colaboradores han descrito recientemente la ausencia de cambios inmunológicos en la especie canina tras la infección experimental por *E. canis*, si bien en este

estudio se observó al inicio de la infección una linfocitosis TCD8+ que posteriormente se resolvió (Hess *et al.*, 2006).

Sin embargo este trabajo se desarrolló únicamente durante las fases aguda y subaguda de la infección, por lo que no es posible descartar el desarrollo de alteraciones en los componentes del sistema inmunitario canino en fases más avanzadas de la enfermedad, como sugieren los propios autores (Hess *et al.*, 2006).

Por otra parte, el incremento en la subpoblación de linfocitos TCD8+ ha sido descrito en el curso de la infección por especies ehrlichiales y se ha asociado en ocasiones con la inmunopatogenia de la enfermedad. Así, se ha sugerido que las células T CD8+ pueden ser responsables directamente del desarrollo de una enfermedad fatal en ratón tras la infección con IOE (Bitsaksis & Winslow, 2006; Ismail *et al.*, 2007).

Las células T CD8+ pueden ser capaces de mediar esta respuesta fatal iniciando directamente respuestas inflamatorias patológicas dependientes de TNF- α o ejerciendo una acción inmunosupresora, al inhibir la acción de los linfocitos T CD4+ (Bitsaksis & Winslow, 2006). Así, se ha descrito que las células T CD8+ median el desarrollo de un shock tóxico inducido por *Ehrlichia* que se asocia con una sobreproducción de IL-10 y TNF- α y apoptosis de células T CD4+ (Ismail *et al.*, 2007).

Finalmente, cabe destacar que la respuesta inmunitaria individual del hospedador también parece ser esencial en el desarrollo del cuadro clínico. En concreto, se ha descrito que el Pastor Alemán podría ser una raza más susceptible a desarrollar formas de EMC más graves y con peor pronóstico que otras razas (Nyindo *et al.*, 1980; Harrus *et al.*, 1997; Neer & Harrus, 2006).

Las variaciones en la susceptibilidad a esta enfermedad podrían deberse a diferencias raciales en la habilidad para desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada. En este sentido, se ha observado que los Pastores Alemanes presentan una respuesta inmunitaria celular frente a *E. canis* deprimida en comparación con la desarrollada por perros de raza Beagle (Nyindo *et al.*, 1980).

2.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Se basa en manifestaciones tales como fiebre, anorexia, descarga nasolagrimal, epístaxis y presencia del vector infestando al enfermo.

Se asocia con enfermedades sistémicas como hemorragia gastrointestinal, hepatopatía, pancreatitis aguda, hipertensión sistémica, septicemia y CID, neoplasia, hipoadrenocorticismo y fiebre maculosa de las Montañas Rocosas.

Enfermedades que cursan con trombocitopenia o con sintomatología hemorrágica en la práctica clínica, ej., intoxicación por estrógenos o con warfarina, otras como la babesiosis, el distemper, la hepatitis infecciosa viral canina, la leptospirosis y la hepatozoonosis.

Enfermedades inmunológicas como las coagulopatías inmunomediadas y el lupus eritematoso sistémico o neoplásicas tales como el mieloma y la leucemia linfocítica crónica.

2.6. *Rhipicephalus sanguineus*

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* pertenece al grupo de las garrapatas duras (familia *Ixodidae*) y es el vector de la Ehrliquiosis Monocítica Canina (EMC); comúnmente se le conoce como “garrapata marrón del perro”. Es originaria de África y es una de las garrapatas más distribuidas del mundo, ya que ha migrado por medio del hombre y sus perros. (Tatchell, 1969, Sauer *et al.*, 1986; Fisher, 2006).

2.6.1 HUÉSPEDES

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* afecta principalmente al perro, pero también puede afectar a una gran variedad de mamíferos y aves terrestres; se pueden mencionar a los gatos, venados, bovinos, liebres, cabras, caballos, borregos, leones, aves (avestruz, pavo, garza), reptiles y el hombre. Es importante mencionar que el perro siempre es el huésped definitivo de elección para la garrapata cuando está presente. (Mehlhorn, 1994; Rojas, 2001).

2.6.2. LOCALIZACIÓN EN EL HUÉSPED

Rhipicephalus sanguineus en el perro se localiza en orejas, cuello y en los espacios interdigitales. En perros con altas infestaciones de garrapatas todos los estados activos pueden ser encontrados atacando partes del cuerpo con pelo. (Rojas, 2001).

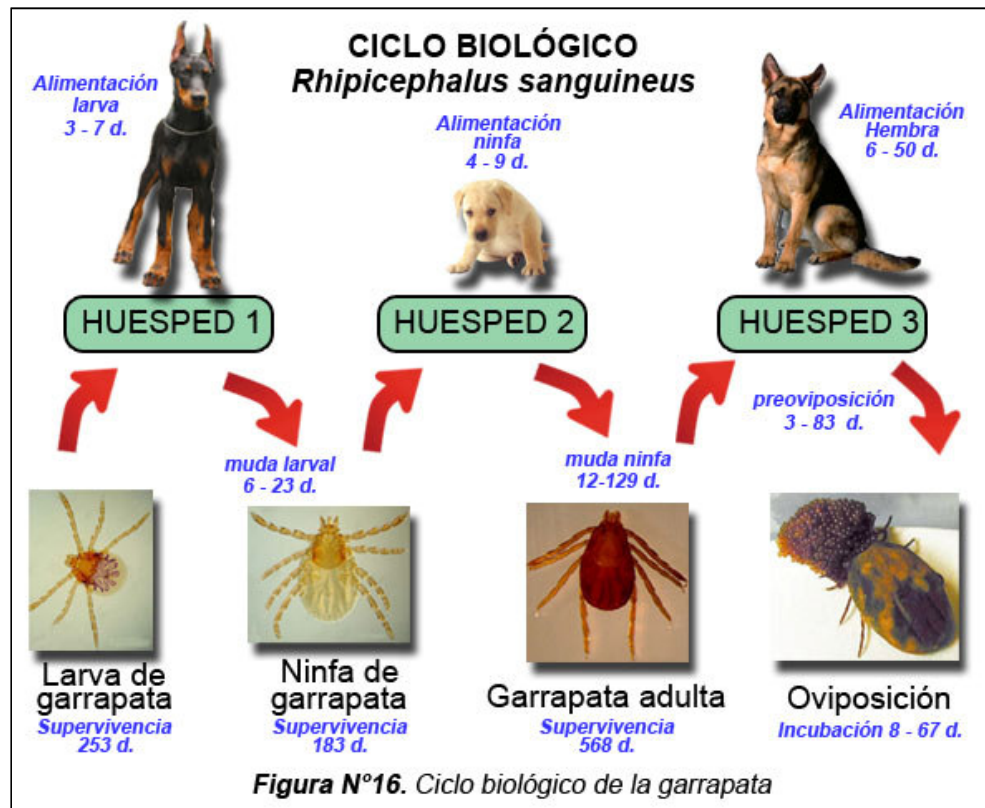
2.6.3 CICLO BIOLÓGICO

Esta garrapata es encontrada en los huéspedes a lo largo de todo el año en zonas tropicales y subtropicales; mientras que en áreas templadas, donde hay cambios climáticos, las garrapatas son encontradas en el huésped a lo largo del verano y pocas en invierno. (Alcaíno *et al.*, 1990; Rojas, 2001). Las etapas inmaduras en la naturaleza se alimentan de los mamíferos pequeños; los perros generalmente son los únicos huéspedes en las etapas inmaduras y adultas. (Rojas, 2001; Breitschwerdt, 2003).

El ciclo de *R. sanguineus* es de tres hospederos, lo que significa que cada uno de las fases móviles después de alimentarse de sangre por unos días, deben de abandonar a los huéspedes para evolucionar en el medio ambiente. La duración del ciclo biológico depende de factores ambientales como la temperatura y humedad. La temperatura óptima para la incubación de los huevos, la transformación de larvas en ninfas y de éstas en adultos, es de 30 °C; el período de cada una de estas etapas se alarga conforme baja la temperatura; mientras que el rango de humedad es más amplio y va de 20 – 93%. En condiciones ambientales ideales el ciclo se completa en aproximadamente 63 días, pero si el ambiente no es favorable el ciclo se puede prolongar por varios meses, durante los cuales la garrapata permanece oculta en un estado de letargia denominado diapausa. (Alcaíno, 1990; Mehlhorn, 1994; Vásquez, 1999; Fisher, 2006).

Las hembras repletas realizan una puesta aproximadamente de 4000 huevos, luego de un período de pre ovoposición que va desde 3 a 83 días, los huevos los ponen en lugares protegidos de la luz y de la desecación. Los huevos de garrapata eclosionan entre los 8 y 67 días; las larvas pasan por un período de maduración tras el cual están capacitadas para fijarse a un primer huésped para alimentarse. Entre los 3 y 7 días post fijación, la larva se suelta y busca un lugar resguardado donde realizar su primera muda y se vuelven ninfas que aparecen entre los 6 y los 23 días después de la caída de la larva repleta y están preparadas para subir a un segundo huésped para volver a alimentarse. Se alimenta por 4 a 9 días pasados los cuales la ninfa repleta se suelta del huésped, cae al suelo y busca un sitio resguardado para realizar la segunda muda a partir de la cual emergerán los adultos entre los 12-129 días después, ya que las ninfas pueden sobrevivir más de 568 días en espera de un huésped. Los machos y hembras adultos se fijan a un tercer huésped para alimentarse; las hembras sólo se fijan y succionan sangre una vez y caen al suelo, mientras que los machos se alimentan en forma intermitente y persisten más tiempo sobre el hospedador, para que la mayoría de las hembras queden fecundadas. Éstas, una vez alimentadas, caen al suelo y buscan un refugio

donde realizar la puesta de huevos y empieza de nuevo el ciclo. (Alcaíno, 1990; Mehlhorn, 1994; Vásquez, 1999; Breitschwerdt, 2003) (Fig. N° 16).



2.6.4. CONTROL

Las garrapatas se pueden controlar de varias formas, por medio de depredadores (hormigas, roedores, aves y otros), modificando el medio (revestir áreas con cemento, etc.), el clima es una gran ayuda en el control de garrapatas, o el uso de medios físicos y químicos. Debido a las diferencias de hábitos entre las diversas especies de garrapatas, en un programa de control deben de determinarse la o las especies que se desean controlar, ya que un plan que es efectivo contra una especie de un solo huésped, puede no funcionar con otra de 3 huéspedes, por lo que es indispensable la identificación, al menos del género, de la garrapata que se quiere controlar. (Rojas, 2001; Kidd, 2003; Fisher, 2006).

Se deben realizar baños con garrapaticidas y la periodicidad de éstos varía de acuerdo con la especie de la garrapata que se desea combatir; está determinado por los días en que se alimentan los diferentes estadios evolutivos, se debe buscar que todos los estadios sean atacados por el ixodicida, con el fin de romper el ciclo. Cuando la garrapata es de tres huéspedes, como la

Rhipicephalus sanguineus, hay que considerar que los estadios inmaduros (larvas y ninfas) pueden no estar en el huésped definitivo, por lo que es necesario también realizar control de las garrapatas en el medio ambiente. Es importante recordar que todos los animales del hogar deben ser tratados para el control de garrapatas. (Rojas, 2001; Fisher, 2006).

2.7. LA DOXICICLINA

El sistema inmunitario puede verse afectado por una gran diversidad de fármacos que actúan principalmente a través de mecanismos inmunosupresores, inmunoestimulantes y de generación de tolerancia inmunitaria (Krensky *et al.*, 2007). La utilización de estas propiedades en la regulación de las respuestas inmunitarias puede resultar en muchas ocasiones beneficiosa en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas o en la prevención del rechazo inmunitario de órganos trasplantados (Krensky *et al.*, 2007, Rang *et al.*, 2008b).

Los inmunosupresores de mayor importancia en la actualidad pueden ser clasificados en cuatro categorías principales: los glucocorticoides, los inhibidores de la calcineurina (como la ciclosporina o el tacrolimus), los antiproliferativos/antimetabólicos de las células inmunitarias (como el sirolimus, la azatioprina o el micofenolato demofetilo) y los agentes biológicos o preparados de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos a células T (como la globulina antitimocítica o el anticuerpo monoclonal anti-CD3 antihumano de tipo IgG2a murino) (Krensky *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2008b).

Estos fármacos inmunosupresores presentan una serie de efectos indeseables, como el riesgo de infecciones por agentes oportunistas o el desarrollo de neoplasias. Esto ha hecho que a menudo se empleen en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o en los trasplantes de órganos otras sustancias que lo que permiten es obtener tolerancia inmunitaria evitando la reacción específica dirigida a un antígeno. A modo de ejemplo, podemos destacar que es posible inducir tolerancia mediante la inhibición de la señalcoestimulante en la presentación antigénica a través del empleo de la molécula de proteína de fusión de tipo recombinante, CTLA4Ig, y anticuerpos monoclonales anti-CD80, CD86 o ambos (Krensky *et al.*, 2007).

Las sustancias que son capaces de ejercer un efecto inmunoestimulador y, por tanto, ser empleadas en el tratamiento de infecciones o inmunodeficiencias, son por lo general menos conocidas y estudiadas. Entre ellas podemos destacar las citocinas recombinantes (interferones, IL-2.). Asimismo, se pueden incluir en este grupo de fármacos con propiedades inmunoestimulantes

las vacunas, que permiten obtener una inmunización activa frente a antígenos concretos, y las inmunoglobulinas, administradas para lograr una inmunización pasiva (Krensky *et al.*, 2007).

Las sustancias mencionadas por el momento son fármacos empleados precisamente por sus efectos sobre la respuesta inmunitaria. Sin embargo, cada vez más fármacos que no han sido tradicionalmente considerados ni inmunosupresores, ni inmunoestimulantes, ni que induzcan tolerancia inmunitaria, han mostrado poseer efectos no específicos sobre el sistema inmunitario.

Entre estas sustancias cabe destacar un amplio grupo de agentes antimicrobianos, que incluyen agentes β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, fluoroquinolonas y tetraciclinas, y que pueden actuar sobre el sistema inmunitario principalmente a través de tres mecanismos (Jiménez-Valera *et al.*, 1997; Hamilton-Miller, 2001; Pasquale & Tan, 2005; Tauber & Nau, 2008):

- Actuando directamente sobre los componentes del sistema inmunitario.
- Induciendo el desarrollo de cambios sobre la superficie de los microorganismos patógenos, haciendo que sean más susceptibles a los mecanismos efectores de la inmunidad.
- Causando la lisis de los microorganismos, con lo que se liberan componentes microbianos que pueden actuar directamente sobre el sistema inmunitario del hospedador.

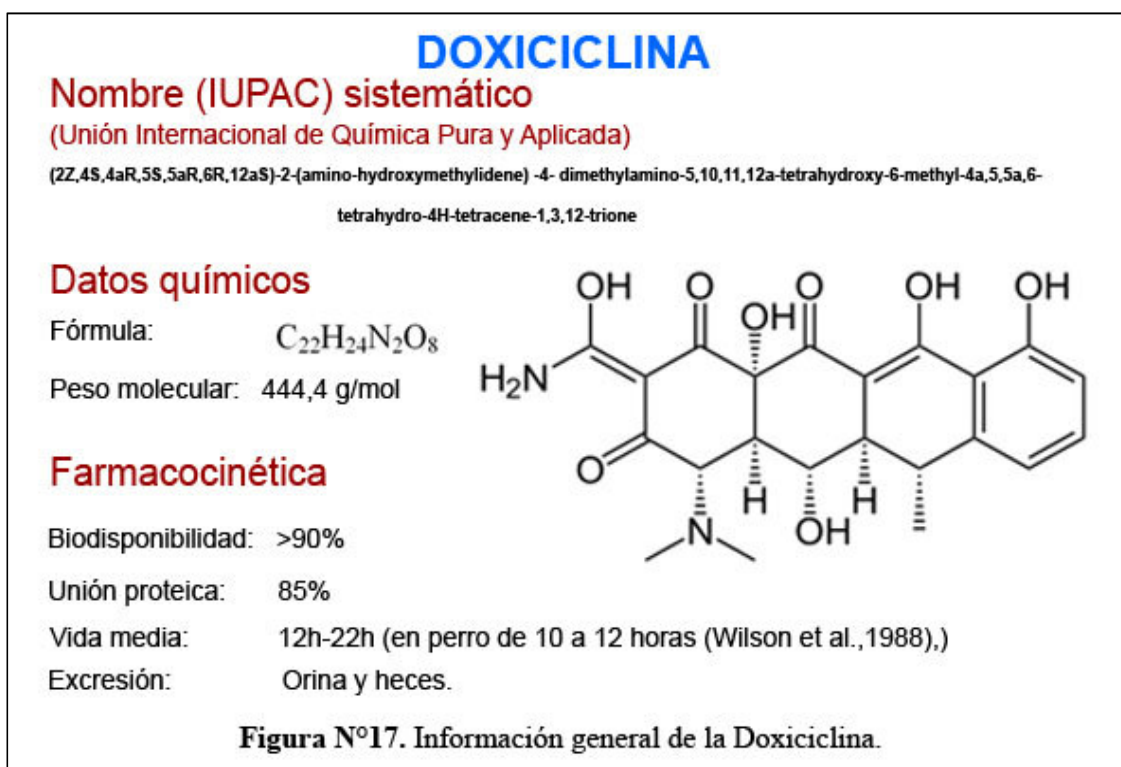
Nos centraremos en los aspectos más relevantes de uno de estos fármacos antimicrobianos, la doxiciclina, y la familia a la que pertenece, las tetraciclinas.

Las tetraciclinas son un grupo de fármacos con actividad bacteriostática que fueron aislados a partir de *Streptomyces aureofaciens* y descritas en 1948 por Benjamin M. Duggar (Duggar, 1948). Se trata de un grupo de compuestos anfóteros que derivan de la naftacenocarboxamida policíclica, núcleo tetracíclico, de donde reciben su nombre (Riviere & Spoo, 2001; Chambers 2007).

Desde su descubrimiento la molécula original ha sufrido numerosas modificaciones estructurales, dando lugar a otras tetraciclinas semisintéticas con propiedades farmacocinéticas y actividades antimicrobianas diferentes (Riviere & Spoo, 2001).

Una de las tetraciclinas de mayor relevancia en la actualidad es la doxiciclina, tetraciclina semisintética que es sintetizada a partir de la oxitetraciclina o la metaciclina y que presenta una mayor liposolubilidad que otros miembros de su familia, lo que le permite una mayor penetración

dentro de las células, confiriéndole una mayor actividad frente a microorganismos intracelulares (Riviere & Spoo, 2001; Walser, *et al.*, 2012) (Fig. N° 17).



2.7.1. EFECTOS EN LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y MECANISMO DE ACCIÓN

De forma general, las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que poseen actividad contra una gran variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas, aerobias y anaerobias, intracelulares y extracelulares (Riviere & Spoo, 2001; Chambers, 2007; Rang *et al.*, 2008a).

También son eficaces frente a algunos agentes patógenos resistentes a antimicrobianos activos contra la pared bacteriana, como ciertos agentes pertenecientes al Orden Rickettsiales (Chambers, 2007; Rang *et al.*, 2008a). Debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro, estos fármacos se encuentran entre los antibióticos más prescritos tanto en medicina humana como en veterinaria.

Además, diversos estudios en el hombre han mostrado que la doxiciclina puede poseer cierta eficacia en el tratamiento de algunas enfermedades parasitarias causadas por protozoos, como la malaria o la leishmaniosis cutánea (Dahl *et al.*, 2006; Masmoudi *et al.*, 2008; Briolant *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2010). Se ha sugerido, incluso, que una combinación de doxiciclina e ivermectina puede ser eficaz en el tratamiento de unanematodosis, la causada por *Dirofilaria immitis* en el perro (Grandi *et al.*, 2010).

Estas sustancias ejercen su acción antibacteriana mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de los microorganismos sensibles, con lo que impiden la unión del ARN taminoacílico al sitio aceptor en el complejo ARNm-ribosoma e inhiben así la síntesis proteica y, por tanto, el crecimiento y multiplicación de los microorganismos (Hash *et al.*, 1964; Day, 1966; Geigenmuller & Nierhaus, 1986; Riviere & Spoo, 2001; Chambers, 2007).

2.7.2. FARMACOCINÉTICA

La administración de la doxiciclina y demás tetraciclinas puede realizarse por vía intravenosa, pero, en general, la administración por vía oral es la ruta preferida en la mayoría de los animales (Riviere & Spoo, 2001).

La absorción en el tracto gastrointestinal puede variar dependiendo de la especie animal y del tipo de formulación empleada, si bien en el caso de la doxiciclina y la minociclina la absorción es prácticamente del cien por ciento (Chambers, 2007).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos compuestos quelan con facilidad los cationes bivalentes, por lo que su absorción disminuye si se administran junto con productos lácteos, sales de calcio, magnesio, hierro o zinc, geles de hidróxido de aluminio, subsalicilato de bismuto, etc. (Riviere & Spoo, 2001; Chambers, 2007).

La vida media de la doxiciclina varía en las diferentes especies animales, habiéndose descrito en la especie canina una vida media de 10 a 12 horas (Wilson *et al.*, 1988), algo inferior a la descrita en el hombre (de 16 a 18 horas) (Chambers, 2007) y muy superior a la del ratón, de tan solo 4 horas (Bellahsene & Forsgren, 1985).

Una vez absorbidas, las diferentes tetraciclinas se unen a las proteínas plasmáticas y se distribuyen extensamente en la mayoría de los tejidos, acumulándose en las células

reticuloendoteliales de hígado, bazo, médula ósea, riñones, en los huesos, dentina y esmalte de los dientes en crecimiento (Riviere & Spoo, 2001; Chambers, 2007; Rang *et al.*, 2008a).

A pesar de la buena distribución descrita para las tetraciclinas, existen diferencias entre los distintos compuestos de este grupo de antimicrobianos y la distribución de cada una de estas sustancias en concreto dependerá de su solubilidad lipídica, lo que provoca que algunas tetraciclinas penetren mejor en ciertos tejidos que otras.

Este es el caso de ladoxíciclina y de la minociclina, que poseen una liposolubilidad cinco a diez veces mayor que el resto de tetraciclinas y, por tanto, penetran mejor en los tejidos (como cerebro, líquido cefalorraquídeo y próstata) y poseen un mayor volumen de distribución y mejores propiedades antimicrobianas globales (Riviere & Spoo, 2001).

La excreción de la doxiciclina se efectúa en su mayor parte con las heces en una forma inactiva, a diferencia de lo que se observa en otras tetraciclinas, en las que aproximadamente el 60% de la dosis es eliminada por filtración glomerular (Riviere & Spoo, 2001; Chambers, 2007) (Fig. N° 18).

Características clínicas de la ehrlichiosis después de 21 días de tratamiento con Doxiciclina (10 mg/kg cada 12 horas, cachorros 6 a 8 mg/kg)

SIGNOS	ANTES DEL TTO. %	DESPUÉS DEL TTO. %	SIGNOS	ANTES DEL TTO.%	DESPUÉS DEL TTO.%
Decaimiento	62.50	7.50	Petequias	2.50	2.50
Pérdida del apetito	52.50	15.00	Tos	2.50	2.50
Mucosas pálidas	42.50	15.00	Secresión ocular	5.00	0.00
Ganglios inflamados	50.00	0.00	Inflamación	5.00	0.00
Depresión	45.00	2.50	Probl. locomotores	5.00	5.00
Debilidad	45.00	2.50	Dific. respiratorias	2.50	2.50
Letargia	45.00	2.50	Conjuntivitis	2.50	0.00
Presencia sangrado	20.00	2.50	Pruritos en los ojos	2.50	2.50
Pérdida de peso	15.00	17.50	Probl. neurológicos	2.50	2.50
Lesiones de piel	20.00	17.50	Ojos inflamados	2.50	0.00
Vómito	15.00	0.00	Lomo arqueado	2.50	15.00
Deshidratación	10.00	0.00	Equimosis	2.50	2.50
Diarrea	12.50	0.00	Convulsiones	2.50	0.00
Desnutrición	7.50	7.50	Cansancio	2.50	2.50
Congestión ocular	10.00	0.00	Arritmia cardíaca	2.50	0.00
Secresión nasal	5.00	0.00	Fiebre	15.00	0.00

Figura N°18. Información basada en Brito, D. 2010.

Esta característica es la responsable de que la doxiciclina ejerza un menor número de efectos adversos, o que produzca efectos secundarios menos marcados que otros miembros de su familia. En concreto, se ha observado que este fármaco induce menos efectos gastrointestinales que otras tetraciclinas, siendo el efecto secundario más comúnmente descrito para esta familia antimicrobiana tanto en animales como en el hombre la aparición de una irritación gástrica e intestinal. No obstante, se ha descrito que, en ocasiones, la doxiciclina puede provocar náuseas y vómitos en perros y gatos, por lo que se recomienda su administración junto con alimento, lo que reduce este efecto adverso. Por otra parte, el uso de la mayoría de las tetraciclinas está desaconsejado en animales con insuficiencia renal, precisamente por esa eliminación por filtración glomerular descrita previamente y que no comparte la doxiciclina. La eliminación de la doxiciclina en forma de conjugado inactivo con las heces hace que pueda ser empleada incluso en perros con una afectación renal (Riviere & Spoo, 2001) (Fig. N° 19).

Parámetros Hematológicos después de 21 días de tratamiento con Doxiciclina (10 mg/kg cada 12 horas, cachorros 6 a 8 mg/kg)

VALORES	ANTES DEL	DESPUÉS DEL		VALOR NORMAL	
	TTO.	Li - Ls	TTO.		Li - Ls
Hemoglobina (g/dl)	10.93	4.30-18.40	12.93	8.50-49.40	12-18
Hematocrito	32.76	13-57	38.32	24.90-58.2	37-55
VCM (fl)	65.67	4.90-86.30	66.88	4.90-86.30	60-77
HCM (%)	22.46	17.20-27.50	28.60	17.3-26.80	19-24
CHCM (g/dl)	33.42	29.3-37.6	34.03	27.7-39.10	33-36
Plaquetas(x10 / mm)³	163.2	6.00-1000	236.07	8.00-529	120-500

Figura. N°19. Datos basados en Brito, D. 2010. Li: Límite inferior, Ls: límite superior

Otros efectos adversos de las tetraciclinas que cabe destacar son la aparición de decoloración de los dientes en crecimiento si son administradas durante el embarazo o durante los primeros meses de vida, debido a la quelación del calcio en la dentina o el esmalte, y el retardo del desarrollo óseo, aunque la doxiciclina parece ejercer estos efectos de forma mucho menos probable que otras tetraciclinas (Riviere & Spoo, 2001).

En humanos menores de 10 años, según el tipo de tetraciclina, ya que no todas, producen el mismo tipo de tinción, se conoce que la tinción varía desde el amarillo al gris, o marrón, en función del medicamento administrado, así tenemos que la Doxiciclina (Vibramicina), no tiñe los dientes (Rivero E., 2008).

También se ha descrito el desarrollo de fototoxicidad en el hombre tras la administración de estos fármacos y, probablemente, también puede aparecer este efecto en otras especies animales. Otros riesgos de la administración de tetraciclinas son las superinfecciones y, si son administradas por vía intravenosa rápida, el colapso circulatorio (Riviere & Spoo, 2001).

Como se ha comentado, estas sustancias poseen excelentes propiedades antimicrobianas para un amplio espectro de agentes infecciosos y, sin embargo, como ocurre en el caso de otros antibióticos, algunas bacterias han sido capaces de desarrollar mecanismos de resistencia frente a ellas, que se transmiten generalmente a través de plásmidos o transposones (Roberts, 1996; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

Entre los diferentes mecanismos de resistencia a la acción de las tetraciclinas desarrollados destacan el eflujo dependiente de energía del fármaco, que es mediado por proteínas transmembrana, la protección del ribosoma de la actuación de la tetraciclina, en la que participan diferentes tipos de proteínas, y la inactivación enzimática de las tetraciclinas (Speer *et al.*, 1992; Roberts, 1996; Taylor & Chau, 1996; Schwarz & Chaslus-Dancla 2001).

2.7.3. EFECTOS NO ANTIMICROBIANOS

Como se ha comentado previamente, la excelente actividad antimicrobiana de la doxiciclina y de otras tetraciclinas no es la única característica que ha hecho que sean tan populares, sino que, de forma temprana tras su descubrimiento, se comenzaron a describir otras propiedades de estos fármacos que son independientes de sus efectos antimicrobianos y que hacen que en la actualidad existan más de 130 ensayos clínicos en marcha evaluando su posible empleo como inmunomoduladores o antiinflamatorios en patologías tan dispares como la artritis reumatoide, la periodontitis, enfermedades dermatológicas de base inmunomediada o ciertos tipos de neoplasias (Tauber & Nau, 2008; Griffin *et al.*, 2010).

Ya en 1950, se comenzaron a describir en la bibliografía ciertos efectos de las tetraciclinas sobre el sistema inmunitario tanto innato como adaptativo, considerándose en un principio estas características como un efecto secundario indeseable de aquellos antimicrobianos que habían sido descubiertos recientemente (Muñoz & Geiser, 1950; Forsgren *et al.*, 1974; Thong & Ferrante, 1979).

Se observó que algunas funciones de los leucocitos polimorfonucleares podían verse inhibidas por las tetraciclinas, como la quimiotaxis, la fagocitosis, la degranulación o la destrucción de los microorganismos fagocitados (Forsgren *et al.*, 1974; Forsgren & Schmeling, 1977; Welch *et al.*, 1981; Gabler & Creamer, 1991). También se describió para las tetraciclinas un efecto inhibitorio de la generación de radicales libres de oxígeno por parte de los neutrófilos (Gabler & Creamer, 1991), lo que influiría en los mecanismos de eliminación de los agentes patógenos. Se ha sugerido que estos efectos inhibitorios sobre las funciones de los neutrófilos podrían estar mediados, al menos en parte, por la quelación de cationes divalentes, especialmente Mg^{2+} y Ca^{2+} (Kloppenburg *et al.*, 1995a).

Las tetraciclinas también ejercen algunos efectos sobre la proliferación y actividad de los linfocitos sanguíneos. Así, Thong y Ferrante en 1979 observaron en estudios experimentales *in vitro* que la doxiciclina y, en menor medida, la tetraciclina y la oxitetraciclina eran capaces de ejercer un potente efecto inhibitorio de las respuestas linfoproliferativas inducidas por mitógenos en linfocitos humanos (Thong & Ferrante, 1979).

En modelos *in vivo*, se ha descrito una disminución de las respuestas de base celular en ratones a los que se les habían administrado tetraciclinas, efecto especialmente marcado con la doxiciclina (Thong & Ferrante, 1980), así como una inhibición de la proliferación de las células T en ratas tras la administración de oxitetraciclina, no observándose este efecto en la población de células B sanguíneas (Van den Bogert & Kroon, 1982).

Posteriormente, se ha descrito una inhibición dosis-dependiente de la proliferación de células T tras la adición de minociclina o doxiciclina en cultivos celulares que se acompaña de una reducción en la producción de diferentes citocinas por parte de estas células, concretamente de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ e $IL-2$, así como de una disminución en la respuesta frente a $IL-2$ en los linfocitos T (Kloppenburg *et al.*, 1995b).

Otras citocinas cuya síntesis parece resultar afectada por las tetraciclinas son la IL-1 y la IL-6 (Milano *et al.*, 1997; Zanjani *et al.*, 2006).

Del mismo modo, se ha descrito una disminución en los niveles en sangre de las citocinas derivadas de células T IFN- γ e IL-10, así como de la citocina inflamatoria TNF- α en pacientes con infección por *Orientia tsutsugamushi* después de administración terapéutica de doxiciclina (Chung *et al.*, 2008).

No obstante, es importante señalar que los efectos que estas sustancias ejercen sobre la síntesis de estos mediadores inmunitarios no son iguales en todos los tipos celulares, habiéndose descrito, al contrario que para los linfocitos T, un efecto inmunoestimulante para los monocitos/macrófagos (Kloppenburger *et al.*, 1996).

El mecanismo por el que se produce esta inhibición de las funciones linfocitarias no se encuentra claramente definido, habiéndose propuesto varias hipótesis que podrían explicarlo. Así, se ha sugerido que la interferencia en la síntesis proteica mitocondrial (Van den Bogert & Kroon, 1982) o el efecto de las tetraciclinas como agentes quelantes de cationes divalentes sobre los niveles intracelulares de calcio en los linfocitos (Kloppenburger *et al.*, 1995b) pueden estar relacionados con esta inhibición. Por otra parte, se ha observado que la doxiciclina es capaz no solo de inhibir la proliferación de los linfocitos T, sino también de inducir la eliminación de estas células mediante apoptosis mediada por la interacción Fas/Fas ligando (Liu *et al.*, 1999).

La actividad de las tetraciclinas sobre las poblaciones linfocitarias no se centra únicamente en los linfocitos T. En este sentido, Kuzin y colaboradores describieron en 2001 que la doxiciclina presenta efectos específicos sobre los linfocitos B, bloqueando selectivamente algunas de las actividades características de los linfoblastos activados y de las células B diferenciadas. Así, se ha descrito que la doxiciclina es capaz de suprimir la secreción de inmunoglobulinas y el cambio de clase en las células B *in vitro* (Kuzin *et al.*, 2001).

Sin embargo, la influencia de las tetraciclinas sobre la síntesis de inmunoglobulinas *in vivo* es controvertida, habiéndose descrito tanto una supresión de la síntesis de anticuerpos (Bellahsene & Forsgren, 1985) como la ausencia de efecto de estas sustancias sobre las respuestas humorales en modelos experimentales (Thong & Ferrante, 1980).

Entre todas las propiedades no antimicrobianas de las tetraciclinas probablemente la mejor caracterizada sea su habilidad para inhibir a las metaloproteinasas (MMPs), familia de endopeptidasas dependientes de zinc que están implicadas en numerosos procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario y la remodelación de tejidos, pero cuya desregulación participa también en la patogenia de ciertos procesos patológicos, entre ellos las neoplasias, la enfermedad periodontal y la artritis reumatoide (Griffin *et al.*,2010). LasMMPs se han clasificado históricamente en función de la especificidad de su sustrato encolagenasas (que incluyen, entre otras, las MMP-1, 8 y 13), gelatinasas (MMP-2 y 9), estromelisininas (MMP-3, 7, 10 y 11) y matrilisininas, pero actualmente se clasifican en función de la estructura de la enzima en cinco grupos de MMPs secretadas y tres de MMPs asociadas a la membrana (MT-MMP) (Egeblad & Werb, 2002).

Desde los estudios de Golub y colaboradores a principios de los años 80 en los que se describía la actividad de la minociclina como inhibidora de la colagenolisis en las encías de ratas con diabetes inducida experimentalmente y en fluido gingival de pacientes con enfermedad inflamatoria periodontal (Golub *et al.*,1983), numerosos estudios han demostrado esta actividad supresora de las tetraciclinas sobre diferentes MMPs, como MMP-2, 8, 9, 12 o 13 (Golub *et al.*,1987; Suomalainen *et al.*,1992; Hanemaaijer *et al.*,1997; Seftor *et al.*,1998a; Golub *et al.*,2001; Lee *et al.*,2001; Grenier *et al.*, 2002; Fiotti *et al.*, 2009, Roomi *et al.*, 2010).

Se ha observado que estos fármacos son capaces de inhibir la actividad de MMPs intersticiales de una gran variedad de fuentes celulares y tisulares, como las originadas en neutrófilos, macrófagos, osteoblastos, condrocitos o células tumorales, o las que se hallan en piel o córnea (Kloppenburger *et al.*,1995a).

Sin embargo, se ha sugerido que las enzimas que parecen estar implicadas de forma más directa en los procesos fisiológicos de remodelado y reparación tisular, como la MMP-1, podrían ser más resistentes al efecto inhibitor de las tetraciclinas (Suomalainen *et al.*, 1992).

El mecanismo por el que las tetraciclinas son capaces de inhibir las MMPs no ha sido aún completamente dilucidado aunque se cree que ejercen sus efectos antiproteolíticos tanto por la inhibición directa de las MMPs como por la inhibición de su expresión (Griffin *et al.*, 2010).

La inhibición directa de las MMPs parece estar mediada por la interacción entre la molécula de la tetraciclina e iones metálicos en la propia MMP, ya que la supresión de estas

enzimas puede revertirse por la adición de Ca²⁺ o Zn²⁺ (Golub *et al.*, 1983, Golub *et al.*, 1987, Griffin *et al.*, 2010).

Se ha observado que las tetraciclinas modificadas químicamente (CMT), que han perdido su capacidad antimicrobiana al eliminarse el grupo dimetilamino de la posición C4 del anillo A, mantienen sus propiedades antiproteolíticas, por lo que ambas propiedades parece que son independientes entre sí y dependen de regiones diferentes de la molécula del fármaco (Golub *et al.*, 1987; Acharya *et al.*, 2004).

Esta característica podría ser beneficiosa de cara a la utilización a largo plazo del grupo de las tetraciclinas en enfermedades no infecciosas, ya que mediante el empleo de estas CMT sin actividad antibiótica se podría evitar la aparición de resistencias bacterianas a estas sustancias (Golub *et al.*, 1987).

La eficacia de la inhibición de estas enzimas por una tetraciclina en concreto depende tanto de las características de la tetraciclina como de la MMPs y del pH, aunque el mecanismo por el que existen estas diferencias es desconocido (Golub *et al.*, 1991; Griffin *et al.*, 2010).

La supresión de ciertas MMPs es beneficiosa en muchos procesos patológicos en los que la proteólisis de la matriz extracelular contribuye a la patogenia y en las que se han encontrado niveles elevados de estas enzimas, como en enfermedades de base inflamatoria y/o tumoral (Griffin *et al.*, 2010), lo que ha justificado el estudio del posible empleo de las tetraciclinas en un gran número de enfermedades tanto en animales como en el hombre. Entre estos estudios destacan los llevados a cabo en modelos de artritis reumatoide y osteoartritis, en los que se ha confirmado que en cultivos de células sinoviales reumatoides obtenidos de pacientes con esta patología las tetraciclinas (más concretamente doxiciclina, CMT-1 y CMT-3) actúan inhibiendo la invasión de la matriz del cartílago por estas células y la actividad catalítica de la MMP-8, así como su síntesis al disminuir la expresión de mRNA de esta MMP (Hanemaaijer *et al.*, 1997, Seftor *et al.*, 1998a).

También, se ha descrito en la bibliografía que el empleo de minociclina en medicina humana en pacientes con artritis reumatoide podría ser beneficioso (Tilley *et al.*, 1995, O'Dell *et al.* 1999), así como el uso de doxiciclina para el tratamiento de osteoartritis en el perro (Nganvongpanit *et al.*, 2009). Son también numerosos los trabajos llevados a cabo en medicina humana evaluando el papel de las tetraciclinas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias periodontales, habiéndose mostrado resultados favorables a este respecto, con disminución de la

colagenolisis en los tejidos blandos y disminución de la resorción ósea (Golub *et al.*, 1983; Golub *et al.*, 1991; Ramamurthy *et al.*, 1998b; Golub *et al.*, 2001; Grenier *et al.*, 2002;).

En cuanto al posible empleo de las tetraciclinas en terapias anticancerígenas, hasta el momento se han documentado resultados prometedores en la reducción de la capacidad invasiva y de metástasis en líneas celulares humanas de melanoma, adenocarcinoma de colon, fibrosarcoma y cáncer cervical y ovárico, así como en modelos experimentales *in vivo* de cáncer de mama (Seftor *et al.*, 1998b; Lee *et al.*, 2001; Duivenvoorden *et al.*, 2002; Roomi *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha observado en modelos experimentales de úlceras corneales estériles en conejo que la administración de tetraciclina sistémica es capaz de reducir dicha ulceración (Seedor *et al.*, 1987).

A su vez, la aplicación tópica de las tetraciclinas podría ser beneficiosa en el tratamiento de heridas crónicas, al haberse detectado una normalización de la curación de las heridas en ratas diabéticas tras la aplicación de CMT-2 (Ramamurthy *et al.*, 1998a).

Otros trabajos que cabe destacar evalúan el papel neuroprotector de estas sustancias en patologías neurodegenerativas, así como su uso en el tratamiento temprano de patologías cardíacas (Zanjani *et al.*, 2006, Familian *et al.*, 2007, Rizzi *et al.*, 2010).

Además de esta actividad sobre las metaloproteinasas, se ha constatado que las tetraciclinas presentan otras propiedades que pueden ayudar a sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. En este sentido, se ha observado que las tetraciclinas dan lugar a una disminución específica de los niveles de la sintasa de óxido nítrico (NOS) al inhibir la expresión de ARNm de NOS, así como a una disminución en la producción de NO. Se ha sugerido que esta habilidad de las tetraciclinas para actuar sobre el NO podría ser la responsable, al menos de forma parcial, de la amplia variedad de propiedades que han demostrado poseer estas sustancias (Amin *et al.*, 1996, Milano *et al.*, 1997, Amin *et al.*, 1997, D'Agostino *et al.*, 1998).

Además, ciertas CMT son capaces de inhibir no sólo la producción de NO, sino también de prostaglandina E2 en diferentes tipos celulares activados (Patel *et al.*, 1999).

A estos efectos sobre el NO y prostaglandina habría que añadir los efectos descritos previamente de las tetraciclinas sobre otros mediadores proinflamatorios, como TNF- α , IL-1 o IL-6, por parte de las células del sistema inmunitario (Kloppenburg *et al.*, 1995b; Milano *et al.*, 1997).

A pesar de la descripción en la bibliografía de esta amplia variedad de propiedades de la doxiciclina y demás tetraciclinas y de la existencia de un elevado número de trabajos en marcha evaluando estas sustancias para su empleo basado en sus funciones no antimicrobianas en patologías inflamatorias, inmunomediadas o tumorales en medicina humana, en veterinaria las referencias bibliográficas que pueden encontrarse se centran básicamente en el empleo de estas sustancias por su papel como antimicrobianos.

III. CONCLUSIONES

1. Hasta ahora se ha detectado en 27 Distritos de Lima la presencia de ehrlichiosis canina en perros.
2. La excesiva producción de anticuerpos junto con una respuesta celular disminuida parece influir decisivamente en la patogenia de la enfermedad.
3. En la fase crónica de la ehrlichiosis monocítica canina se puede observar también la existencia de daño renal, aunque en este caso se asocia con el desarrollo de una glomerulonefritis con síndrome nefrótico.
4. La eliminación de la doxiciclina en forma de conjugado inactivo con las heces hace que pueda ser empleada incluso en perros con una afectación renal.
5. La dosis recomendada debe ser de 10 mg/Kg dos veces al día.
6. La acción inhibitoria inmune de la Doxiciclina potencializa la recuperación del animal.

IV. RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos de investigación comparativos de la Doxiciclina con otros antibióticos, pero a dosis de 10 mg/ Kg de peso 2 veces al día.
2. A nivel de Estado, sensibilizar a la población sobre el control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten.

V. LITERATURA CITADA

1. **Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008a.** "Inmunidad frente a microbios" in *Inmunología celular y molecular*, eds.A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 351-373.
2. **Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008b.** "Inmunidad Innata" in *Inmunología Celular y Molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn. Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 19-46.
3. **Acharya, M.R., Venitz, J., Figg, W.D. & Sparreboom, A. 2004.** "Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases", *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, vol. 7, n°. 3, pp. 195-208.
4. **Adrianzen, J.; Chávez, A.; Casas, E. C. 2003.** Seroprevalencia de la Dirofilariosis y Ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Rev. Investig. Vet. Perú*, Vol.14, no.1, p.43-48.ISSN 1609-9117.
5. **Aguirre, E. Ayllon, T., Sainz, A., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F. & Tesouro, M.A. 2009.** "Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*", *Veterinary journal* (London, England: 1997), vol. 182, no. 2, pp. 301-305.
6. **Akkoyunlu, M. & Fikrig, E. 2000.** "Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia", *Infection and immunity*, vol. 68, no. 4, pp. 1827-1833.

7. **Alcaíno, H et al. 1990.** Archivos de Medicina Veterinaria, XXII No. 2: Ecología del *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae) en la Región Metropolitana de Chile (Chile) 159 – 168.
8. **Amin, A.R., Attur, M.G., Thakker, G.D., Patel, P.D., Vyas, P.R., Patel, R.N., Patel, I.R. & Abramson, S.B. 1996.** "A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 24, pp. 14014-14019.
9. **Amin, A.R., Patel, R.N., Thakker, G.D., Lowenstein, C.J., Attur, M.G. & Abramson, S.B. 1997.** "Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines", *FEBS letters*, vol. 410, no. 2-3, pp. 259-264.
10. **Amusatogui, I., Tesouro, M.A., Kakoma, I. & Sainz, A. 2008.** "Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain", *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, vol. 8, no. 6, pp. 797-803.
11. **Arraga, C. 1992.** Ehrlichiosis canina en Maracaibo, estado Zulia, Venezuela: Reporte de 55 casos. *Rev. Cient. FCV. LUZ*, 2: 41-52.
12. **Arraga, C.; Montero, M.; Bernardoni, A.; Anderson, B. y Parra, O. 1996.** Ehrlichiosis humana: Reporte del primer caso en Venezuela. *Invest. Clín.*, 37(1): 35-49.
13. **Ayllón Santiago, Tania; 2010.** Enfermedades vectoriales en gatos de la comunidad de Madrid: Estudio serológico, molecular y epidemiológico de la infección por "*Ehrlichia spp*, *Anaplasma spp*, *Neorickettsia spp*, *Leishmania spp* y *Bartonella spp*". Universidad Complutense de Madrid.
14. **Ayllón, T. Tesouro, M.A. & Sainz, A. 2009.** "Serology, PCR and culture of *Ehrlichia / Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain". *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol, 15 Suppl. 2, pp. 4-5.
15. **Baneth, G. 2006.** IP - Infectious & parasitic diseases: canine ehrlichiosis – a silent killer. 31st World Small Animal Veterinary Congress (República Checa) 479-483.
16. **Barnewall, R.E. & Rikihisa, Y. 1994.** "Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin", *Infection and immunity*, vol. 62, no. 11, pp. 4804-4810.
17. **Barnewall, R.E., Rikihisa, Y. & Lee, E.H. 1997.** "*Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor", *Infection and immunity*, vol. 65, no. 4, pp. 1455-1461.

18. **Barrios A., Luis. Li E., Olga. Suárez A., Francisco et al. 2013.** Evidencia hematológica y serológica de *Ehrlichia spp* en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis en Lima Metropolitana. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú [en línea], vol.24, no.1, p. 64-71. ISSN 1682-3419.).
19. **Bellahsene, A. & Forsgren, A. 1985.** "Effect of doxycycline on immune response in mice", *Infection and immunity*, vol. 48, no. 2, pp. 556-559.
20. **Bitsaktsis, C. & Winslow, G. 2006.** "Fatal recall responses mediated by CD8 T cells during intracellular bacterial challenge infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 177, no. 7, pp. 4644-4651.
21. **Bitsaktsis, C., Huntington, J. & Winslow, G. 2004.** "Production of IFN-gamma by CD4 T cells is essential for resolving ehrlichia infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 11, pp. 6894-6901.
22. **Bitsaktsis, C., Nandi, B., Racine, R., MacNamara, K.C. & Winslow, G. 2007.** "T-Cell-independent humoral immunity is sufficient for protection against fatal intracellular ehrlichia infection", *Infection and immunity*, vol. 75, no. 10, pp. 4933-4941.
23. **Breitschwerdt, E. B. (2003).** "Canine and feline ehrlichiosis: new developments." 19th Annual Congress of the ESVDECVD, Tenerife, Spain.
24. **Breitschwerdt, E. B.; Hegarty, B. C., and Hancock, S. I. 1998.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J. Clin. Microbiol.*; 36(9):2645-2651.
25. **Breitschwerdt, E.B. 2003.** Suplemento del Compendio Sobre Educación Continua para el Veterinario en Práctica. Vol. 24, 1-A. pp. 155.
26. **Breitschwerdt, E.B., Abrams-Ogg, A.C., Lappin, M.R., Bienzle, D., Hancock, S.I., Cowan, S.M., Clooten, J.K., Hegarty, B.C. & Hawkins, E.C. 2002.**"Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 16, no. 6, pp. 642-649.
27. **Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Hancock, S.I. 1998a.** "Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 42, no. 2, pp. 362-8.
28. **Breitschwerdt, E.B., Woody, B.J., Zerbe, C.A., De Buysscher, E.V. & Barta, O. 1987.** "Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 2-9.

29. **Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C., and Hancock, S.I. 1998b.** Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother*; 42:362-368.
30. **Briolant, S., Almeras, L., Belghazi, M., Boucomont-Chapeaublanc, E., Wurtz, N., Fontaine, A., Granjeaud, S., Fusai, T., Rogier, C. & Pradines, B. 2010.** "*Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment", *Malaria journal*, vol. 9, pp. 141.
31. **Brito, L. 2010.** "Parámetros hematológicos y clínicos en caninos con ehrlichiosis, sometidos al tratamiento con Dossxiciclina". , Tesis de grado, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre. 47p.
32. **Brouqui, P. and Raoult, D. 1990.** In vitro susceptibility of *Ehrlichia sennetsu* to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother*; 34(8):1593-1596.
33. **Caldwell, C.W., Everett, E.D., McDonald, G., Yesus, Y.W., Roland, W.E. & Huang, H.M. 1996.** "Apoptosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis", *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 105, no. 5, pp. 640-646.
34. **Carrillo LM, Betancur S, Roldán D, Pérez TE, Galeano D, Loaiza ET, Giraldo CA. 2012.** Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *Rev. CES Med. Vet. Zootec*; Vol 7 (2): 38-46.
35. **Casadevall, A. 1998.** "Antibody-mediated protection against intracellular pathogens", *Trends Microbiol*, vol. 6, no. 3, pp.102-7.
36. **Chambers, H.E. 2007.** "Inhibidores de la síntesis de proteínas y otros antibacterianos" in *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, eds. L.L. Brunton, J.S. Lazo & K.L. Parker, Undécima edn. Mc Graw Hill, México, pp. 1173-1201.
37. **Chapes, S.K. & Ganta, R.R. 2008.** "Defining the immune response to *Ehrlichia* species using murine models", *Veterinary Parasitology*, vol. 158, no. 4, pp. 344-359.
38. **Chavera, A.; Viera, F. y Samamé, H. 1982.** Ehrlichiosis Canina en el Perú. *Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias*, Ica – Perú.
39. **Chung, D.R., Lee, Y.S. & Lee, S.S. 2008.** "Kinetics of inflammatory cytokines in patients with scrub typhus receiving doxycycline treatment", *The Journal of infection*, vol. 56, no. 1, pp. 44-50.
40. **Codner, E.C. & Farris-Smith, L.L. 1986.** "Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 189, no. 1, pp. 47-50.

41. **Codner, E.C. & Maslin, W.R. 1992b.** "Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection", *Am J Vet Res*, vol. 53, no. 3, pp. 294-9.
42. **Codner, E.C., Caceci, T., Saunders, G.K., Smith, C.A., Robertson, J.L., Martin, R.A. & Troy, G.C. 1992a.** "Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection", *Am J Vet Res*, vol. 53, no.12, pp. 2286-91.
43. **Codner, EC, Roberts, RE, Ainsworth, AG. 1985.** Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*; 186:166-9.
44. **Cohn, L.A. 2003.** "Ehrlichiosis and related infections", *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* vol. 33, no. 4, pp. 863-84.
45. **Contreras S., A., Gavidia CH., C., Li E., O., Díaz C., D., Hoyos S., L. 2006.** Estudio retrospectivo de caso-control de ehrlichiosis canina en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Período 2002 – 2005. *Rev. Inv. Vet. Perú*; 20 (2): 270 – 276.
46. **Cowell, R.L., Tyler, R.D., Clinkenbeard, K.D. & Meinkoth, J.H. 1988.** "Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 192, no. 8, pp. 1093-1095.
47. **Cupp, E.W 1991.** Biology of ticks: Tick-transmitted diseases. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*; 21(1):1-26
48. **Dagnone, A. S., H. S. de Morais, M. C. Vidotto, F. S. Jojima, and O. Vidotto. 2003.** Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet. Parasitol.*117:285-290.
49. **D'Agostino, P., Arcoleo, F., Barbera, C., Di Bella, G., La Rosa, M., Misiano, G., Milano, S., Brai, M., Cammarata, G., Feo, S. & Cillari, E. 1998.** "Tetracycline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages", *Eur J Pharmacol*, vol. 346, no. 2-3, pp. 283-90.
50. **Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L. & Rosenthal, P.J. 2006.** "Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 9, pp. 3124-3131.
51. **Davoust, B., Keundjian, A., Rous, V., Maurizi, L. & Parzy, D. 2005.** "Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline", *Vet Microbiol.* vol. 107, no. 3-4, pp. 279-83.

52. **Davoust, B., Marie, J.L., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D. & Beugnet, F. 2003.** "Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas", *Veterinary Parasitology*, vol. 112, no. 1-2, pp. 91-100.
53. **Dawson, J.E., Anderson, B.E., Fishbein, D.B., Sanchez, J.L., Goldsmith, C.S., Wilson, K.H. & Duntley, C.W. 1991.** "Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, no. 12, pp. 2741-2745.
54. **Day, L.E. 1966.** "Tetracycline inhibition of cell-free protein synthesis. I. Binding of tetracycline to components of the system", *Journal of Bacteriology*, vol. 91, no. 5, pp. 1917-1923.
55. **Donatien, A. & Lestoquard, F. 1935.** "Existence en Algerie d'une *Rickettsia* du chein", *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, vol. 28, pp. 418-419.
56. **Duggar, B.M. 1948.** "Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 51, no. Art. 2, pp. 177-181.
57. **Duivenvoorden, W.C., Popovic, S.V., Lhotak, S., Seidlitz, E., Hirte, H.W., Tozer, R.G. & Singh, G. 2002.** "Doxycycline decreases tumor burden in a bone metastasis model of human breast cancer", *Cancer research*, vol. 62, no. 6, pp. 1588-1591.
58. **Dumler, J.S., Triggiani, E.R., Bakken, J.S., Aguero-Rosenfeld, M.E. & Wormser, G.P. 2000.** "Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis", *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, vol. 7, no. 1, pp. 6-8.
59. **Dumler, J.S.; A.F. Barbet; C.P.J. Bekker; G.A. Dasch; G.H. Palmer; S.C. Ray; Y. Rikihisa; F.R. Rurangirwa. 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* an HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocutophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2145-2165.
60. **Eddlestone, S.M., Diniz, P.P., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Cho, D., Hosgood, G., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E.B. 2007.** "Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21, no. 6, pp. 1237-1242.
61. **Eddlestone, S.M., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Gill, A., Hosgood, G., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. B. 2006.** "Failure of imidocarb dipropionato to clear

- experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 20, no. 4, pp. 840-844.
62. **Egeblad, M. & Werb, Z. 2002.** "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression", *Nature reviews.Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 161-174.
 63. **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. *Comparative immunology microbiology and infectious diseases*; Lugar: Amsterdam; vol. 36 p. 169 – 173.
 64. **Estrada-Peña, A. & Reme, C. 2005.** "Efficacy of a collar impregnated with amitraz and pyriproxyfen for prevention of experimental tick infestations by *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, and *Ixodes scapularis* in dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 226, no. 2, pp. 221-224.
 65. **Ettinger, S. J. 1992.** Tratado de Medicina Interna. Enfermedades del perro y del gato. México: Intermédica: p 297 – 299.
 66. **Familian, A., Eikelenboom, P. & Veerhuis, R. 2007.** "Minocycline does not affect amyloid beta phagocytosis by human microglial cells", *Neuroscience letters*, vol. 416, no. 1, pp. 87-91.
 67. **Feng, H.M. & Walker, D.H. 2004.** "Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 72, no. 2, pp. 966-971.
 68. **Feng, H.M., Popov, V.L. & Walker, D.H. 1994.** "Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with *Rickettsia conorii*-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease", *Infection and immunity*, vol. 62, no. 5, pp. 1952-1960.
 69. **Fermín, N. 2005.** Estudio en capa blanca para el diagnóstico de ehrlichiosis en caninos del municipio Mariño. Porlamar, estado Nueva Esparta. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
 70. **Fiotti, N., Altamura, N., Moretti, M., Wassermann, S., Zacchigna, S., Farra, R., Dapas, B., Consoloni, L., Giacca, M., Grassi, G. & Giansante, C. 2009.** "Short term effects of doxycycline on matrix metalloproteinases 2 and 9", *cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, vol. 23, no. 2, pp. 153-159.
 71. **Fisher, M; McGarry, J. 2006.** "Fundamentos de Parasitología en Animales de Compañía". Alemania. Intermedica S.A. 137p.
 72. **Forsgren, A. & Schmeling, D. 1977.** "Effect of antibiotics of chemotaxis of human leukocytes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 11, no. 4, pp. 580-584.

73. **Forsgren, A., Schmeling, D. & Quie, P.G. 1974.** "Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes", *The Journal of infectious diseases*, vol. 130, no. 4, pp. 412-415.
74. **Frank, J.R. & Breitschwerdt, E.B. 1999.** "A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia", *J Vet Intern Med*, vol. 13, no. 3, pp. 194-201.
75. **Gabler, W.L. & Creamer, H.R. 1991.** "Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines", *Journal of periodontal research*, vol. 26, no. 1, pp. 52-58.
76. **Ganta, R.R., Wilkerson, M.J., Cheng, C., Rokey, A.M. & Chapes, S.K. 2002.** "Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes", *Infect. Immun.* vol. 70, no. 1, pp.380-8.
77. **Geigenmuller, U. & Nierhaus, K.H. 1986.** "Tetracycline can inhibit tRNA binding to the ribosomal P site as well as to the A site", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 161, no. 3, pp. 723-726.
78. **Gokce, H.I. & Woldehiwet, Z. 1999.** "Lymphocyte responses to mitogens and rickettsial antigens in sheep experimentally infected with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*", *Vet Parasitol*, vol. 83, no. 1, pp. 55-64.
79. **Golub, L.M., Lee, H.M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T.F., Kaplan, R. & Ramamurthy, N.S. 1983.** "Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action", *Journal of periodontal research*, vol. 18, no. 5, pp. 516-526.
80. **Golub, L.M., McNamara, T.F., D'Angelo, G., Greenwald, R.A. & Ramamurthy, N.S. 1987.** "A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity", *Journal of dental research*, vol. 66, no. 8, pp. 1310-1314.
81. **Golub, L.M., McNamara, T.F., Ryan, M.E., Kohut, B., Blieden, T., Payonk, G., Sipos, T. & Baron, H.J. 2001.** "Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis", *Journal of clinical periodontology*, vol. 28, no. 2, pp. 146-156.
82. **Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F., Greenwald, R.A. & Rifkin, B.R. 1991.** "Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs", *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 2, no. 3, pp. 297- 321.
83. **Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G. & Kramer, L. 2010.** "A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*)", *Veterinary parasitology*, vol. 169, no. 3-4, pp. 347-351.

84. **Greene, C.E. & Breitschwerdt, E.B. 2006.** "Rocky Mountain Spotted Fever. Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever." in *Infectious Diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 232-245.
85. **Greene, C.E. and Harvey, J.W. Canine ehrlichiosis 1984.** En: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C.E. Greene (Ed). W.B. Saunders. Philadelphia; p 704-709.
86. **Greene, R.T. 1995.** "Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors" in *Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice*, eds. J.D. Bonagura & R.W. Kirk, WB Saunders, Philadelphia, pp. 290-293.
87. **Greene, R.T. 1997.** Ehrlichiosis canina: implicaciones clínicas de factores humorales, En: *Kirk. Terapéutica veterinaria de pequeños animales*. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 317-320.
88. **Grenier, D., Plamondon, P., Sorsa, T., Lee, H.M., McNamara, T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Teronen, O. & Mayrand, D. 2002.** "Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives", *Journal of periodontology*, vol. 73, n°. 1, pp. 79-85.
89. **Griffin, M.O., Fricovsky, E., Ceballos, G. & Villarreal, F.J. 2010.** "Tetracyclines: A pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature", *American journal of physiology. Cell. physiology*.
90. **Grindem, C.B., Breitschwerdt, E.B., Perkins, P.C., Cullins, L.D., Thomas, T.J. & Hegarty, B.C. 1999.** "Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis", *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 35, no. 1, pp. 56-61.
91. **Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L. & Huxsoll, D.L. 1975.** "Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*)", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 36, no. 7, pp. 937-940.
92. **Hamilton-Miller, J.M. 2001.** "Immunopharmacology of antibiotics: direct and indirect immunomodulation of defence mechanisms", *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, vol. 13, no. 2, pp. 107-111.
93. **Hanemaaijer, R., Sorsa, T., Konttinen, Y.T., Ding, Y., Sutinen, M., Visser, H., van Hinsbergh, V.W., Helaakoski, T., Kainulainen, T., Ronka, H., Tschesche, H. & Salo, T. 1997.** "Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and

- endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 50, pp. 31504-31509.
94. **Harrus, S. & Waner, T. 2010.** "Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview", *Veterinary journal (London, England : 1997)*,
 95. **Harrus, S., Day, M.J., Waner, T. & Bark, H. 2001.** "Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*", *Vet Microbiol.* vol. 83, no. 4, pp. 343-9.
 96. **Harrus, S., Kass, P.H., Klement, E. & Waner, T. 1997.** "Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease", *Vet Rec.* vol. 141, no. 14, pp. 360-3.
 97. **Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I. & Waner, T. 1998a.** "Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection", *Veterinary parasitology*, vol. 78, no. 2, pp. 155-160.
 98. **Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I. & Bark, H. 1998b.** "Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course", *J Clin. Microbiol.* vol. 36, no. 7, pp. 2140-2.
 99. **Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H. & Bark, H. 1996a.** "Serum protein alterations in canine ehrlichiosis", *Veterinary parasitology*, vol. 66, no. 3-4, pp. 241-249.
 100. **Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F. & Cornelissen, A.W. 1999.** "Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis", *J Clin Microbiol.* vol. 37, no. 9, pp. 2745-9.
 101. **Harrus, S., Waner, T., Friedmann-Morvinski, D., Fishman, Z., Bark, H. & Harmelin, A. 2003.** "Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 96, no. 3-4, pp. 239-43.
 102. **Harrus, S., Waner, T., Keysary, A., Aroch, I., Voet, H. & Bark, H. 1998c.** "Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 62, no. 1, pp. 15-27.
 103. **Harrus, S., Waner, T., Weiss, D.J., Keysary, A. & Bark, H. 1996b.** "Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 51, no. 1-2, pp. 13-20.
 104. **Hash, J.H., Wishnick, M. & Miller, P.A. 1964.** "On the Mode of Action of the Tetracycline Antibiotics in *Staphylococcus aureus*", *The Journal of biological chemistry*, vol. 239, pp. 2070-2078.

105. **Heeb, H.L., Wilkerson, M.J., Chun, R. & Ganta, R.R. 2003.** "Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog", *J Am Anim. Hosp. Assoc.* vol. 39, no. 4, pp. 379-84.
106. **Hess, P.R., English, R.V., Hegarty, B.C., Brown, G.D. & Breitschwerdt, E.B. 2006.** "Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression", *Vet Immunology and Immunopathology*, vol. 109, no. 1-2, pp. 117-25.
107. **Hibler, S.C., Hoskins, J.D. & Greene, C.E. 1986.** "Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia", *Compendium Continuing Education Practice Veterinary*, vol. 8, pp. 106-114.
108. **Hildebrandt, Paul; Conroy, J.; McKee, A.; Nyindo, M. and Huxsoll, D. 1973.** "Ultrastructure of *Ehrlichia canis*" American Society for Microbiology, Infection and Immunity, p. 265 – 271.
109. **Hinrichsen, V.L., Whitworth, U.G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Mather, T.N. 2001.** "Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 218, no. 7, pp. 1092-1097.
110. **Hori-Oshima, S., G. L. Tinoco, S. A. Barreras, M. Moro, and J. Viñasco. 2006.** Detección de *Ehrlichia canis* mediante ELISA y PCR en perros de Mexicali, Baja California. *En: VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria*. Set. 28 -30. Asociación Mexicana de Parasitólogos Veterinarios, A.C., México.
111. **Huang, H., Lin, M., Wang, X., Kikuchi, T., Mottaz, H., Norbeck, A. & Rikihisa, Y. 2008.** "Proteomic analysis of and immune responses to *Ehrlichia chaffeensis* lipoproteins", *Infection and immunity*, vol. 76, no. 8, pp. 3405-3414.
112. **Huber W.G. 1977.** Tetracyclines. *En: Veterinary pharmacology and therapeutics*. L.M.Jones (ed). Iowa State University Press. Ames.p 929 – 939.
113. **Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Amyx, H.L. & Ferguson, J.A. 1970.** "Epizootiology of tropical canine pancytopenia", *Journal of wildlife diseases*, vol. 6, no. 4, pp. 220-225.
114. **Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Ferguson, J.A. & Walker, J.S. 1969.** "*Ehrlichia canis* the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs?". *The Veterinary record*, vol. 85, no. 21, pp. 587.
115. **Iqbal, Z. & Rikihisa, Y. 1994b.** "Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment", *J Clin. Microbiol.* vol. 32, no. 7, pp. 1644-9.

116. **Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W. & Rikihisa, Y. 1994a.** "Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis", *J. Clin. Microbiol.* Vol. 32, n°. 7, pp. 1658-62.
117. **Ismail, N., Soong, L., McBride, J.W., Valbuena, G., Olano, J.P., Feng, H.M. & Walker, D.H. 2004.** "Overproduction of TNF-alpha by CD8+ type 1 cells and down-regulation of IFN-gamma production by CD4+ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 3, pp. 1786-1800.
118. **Ismail, N., Crossley, E.C., Stevenson, H.L. & Walker, D.H. 2007.** "Relative importance of T-cell subsets in monocytotropic ehrlichiosis: a novel effector mechanism involved in *Ehrlichia*-induced immunopathology in murine ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 75, no. 9, pp. 4608-4620.
119. **Jimenez-Valera, M., Moreno, E. & Ruiz-Bravo, A. 1997.** "Immunomodulation by antimicrobial agents", *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 2, pp. 83-94.
120. **Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W. & Kocan, K.M. 1998.** "Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae)", *Veterinary parasitology*, vol. 74, no. 2-4, pp. 277-288.
121. **Kakoma, I., Carson, C.A., Ristic, M., Stephenson, E.M., Hildebrandt, P.K. & Huxsoll, D.L. 1978.** "Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 20, no. 1, pp. 242-247.
122. **Kaylor, P.S., Crawford, T.B., McElwain, T.F. & Palmer, G.H. 1991.** "Passive transfer of antibody to *Ehrlichia risticii* protects mice from ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 59, no. 6, pp. 2058-2062.
123. **Kern T.J. 1994.** Manifestaciones oculares de enfermedad sistémica, En: *Kirk RW, Bonagura JD. Terapéutica veterinaria de pequeños animales.* Interamericana-McGraw-Hill. Nueva York. pp. 1182-1186.
124. **Kidd, L; Breitschwerdt, E.B. 2003.** Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compendium*; 25(10):742-751.
125. **Kloppenborg, M., Brinkman, B.M., de Rooij-Dijk, H.H., Miltenburg, A.M., Daha, M.R., Breedveld, F.C., Dijkmans, B.A. & Verweij, C. 1996.** "The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 4, pp. 934-940.

126. **Kloppenborg, M., Dijkmans, B.A. & Breedveld, F.C. 1995a.** "Antimicrobial therapy for rheumatoid arthritis", *Bailliere's Clinical Rheumatology*, vol. 9, no. 4, pp. 759-769.
127. **Kloppenborg, M., Verweij, C.L., Miltenburg, A.M., Verhoeven, A.J., Daha, M.R., Dijkmans, B.A. & Breedveld, F.C. 1995b.** "The influence of tetracyclines on T cell activation", *Clinical and experimental immunology*, vol. 102, no. 3, pp. 635-641.
128. **Krensky, A.M., Vincenti, F. & Bennett, W.M. 2007.** "Inmunosupresores, tolerógenos e inmunoestimulantes" in *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, eds. L.L. Brunton, J.S. Lazo & K.L. Parker, Undécima edn. Mc Graw Hill, México D.F., pp. 1405-1431.
129. **Kuzin, I.I., Snyder, J.E., Ugine, G.D., Wu, D., Lee, S., Bushnell, T., Jr, Insel, R.A., Young, F.M. & Bottaro, A. 2001.** "Tetracyclines inhibit activated B cell function", *International immunology*, vol. 13, no. 7, pp. 921-931.
130. **Larsen, H.J., Overnes, G., Waldeland, H. & Johansen, G.M. 1994.** "Immunosuppression in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*", *Research in veterinary science*, vol. 56, no. 2, pp. 216-224.
131. **Lee, E.H. & Rikihisa, Y. 1996.** "Absence of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 (IL-6), and granulocytemacrophage colony-stimulating factor expression but presence of IL-1beta, IL-8, and IL-10 expression in human monocytes exposed to viable or killed *Ehrlichia chaffeensis*", *Infection and immunity*, vol. 64, no. 10, pp. 4211-4219.
132. **Lee, E.H. & Rikihisa, Y. 1997.** "Anti-*Ehrlichia chaffeensis* antibody complexed with *E. chaffeensis* induces potent proinflammatory cytokine mRNA expression in human monocytes through sustained reduction of IkappaB-alpha and activation of NF-kappaB", *Infection and immunity*, vol. 65, no. 7, pp. 2890-2897.
133. **Lee, H.M., Golub, L.M., Cao, J., Teronen, O., Laitinen, M., Salo, T., Zucker, S. & Sorsa, T. 2001.** "CMT-3, a nonantimicrobial tetracycline (TC), inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer", *Current medicinal chemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 257-260.
134. **León, A., Demedio, J., Márquez, M., Castillo, E., Perera, A., Zuaznaba, O., Caníbal, J., Gonzalez, B., Reynaldo, L., Vega, N., Blanco, D., Ronda, M., Peña, A., Seija, V., 2008.** Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de la Habana. Revista Electrónica de Clínica Veterinaria. Vol III, N° 5.
135. **Lepidi, H., Bunnell, J.E., Martin, M.E., Madigan, J.E., Stuen, S. & Dumler, J.S. 2000.** "Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 62, no. 1, pp. 29-37.

136. **Lewis, G.E., Jr. Ristic, M., Smith, R.D., Lincoln, T. & Stephenson, E.H. 1977.** "The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 38, no. 12, pp. 1953-1955.
137. **Lin, M. & Rikihisa, Y. 2003.** "*Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival", *Infect Immun*, vol. 71, no. 9, pp. 5324-31.
138. **Lin, M. & Rikihisa, Y. 2004.** "*Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes", *Cell Microbiol*, vol. 6, no. 2, pp. 175-86.
139. **Liu, J., Kuszynski, C.A. & Baxter, B.T. 1999.** "Doxycycline induces Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes", *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 260, no. 2, pp. 562-7.
140. **López J., K. Abarca., M. Isabel Mundaca, C. Caballero, F. Valiente-Echevarría. 2012.** "Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile" *Rev. Chilena Infectol*; 29 (5): 527-530
141. **López, J.; A. Castillo; M. Muñoz; S. Hildebrandt. 1999.** Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, Informe preliminar. *Arch. Med. Vet.* 31(2): 211-214.
142. **Lorente, C., Sainz, A. & Tesouro, M.A. 2008.** "Immunophenotype of dogs with subclinical ehrlichiosis", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1149, pp. 114-117.
143. **MacNamara, K.C., Racine, R., Chatterjee, M., Borjesson, D. & Winslow, G.M. 2009.** "Diminished hematopoietic activity associated with alterations in innate and adaptive immunity in a mouse model of human monocytic ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 77, no. 9, pp. 4061-4069.
144. **Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R.C., Ristic, M., Cox, D. & McDade, J.E. 1987.** "Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia", *The New England journal of medicine*, vol. 316, no. 14, pp. 853-856.
145. **Martin, M.E., Caspersen. K. & Dumler, J.S. 2001.** "Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon-gamma and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis", *The American journal of pathology*, vol. 158, no. 5, pp. 1881-1888.
146. **Masmoudi, A., Dammak, A., Chaaben, H., Maalej, N., Akrouf, F. & Turki. H. 2008.** "Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis", *Dermatology online journal*, vol. 14, no. 8, pp. 22.

147. **Matthewman, L.A., Kelly, P.J., Brouqui, P. & Raoult, D. 1994.** "Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection", *Journal of the South African Veterinary Association*, vol. 65, no. 3, pp. 104-107.
148. **Mavromatis, K., Doyle, C.K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M.P., Chain, P., Shin, M., Malfatti, S., Larimer, F., Copeland, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Yu, X.J., Walker, D.H., McBride, J.W. & Kyrpides, N.C. 2006.** "The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies", *J Bacteriol*, vol. 188, no. 11, pp. 4015-23.
149. **McBride, J.W., Corstvet, R., Gaunt, S., Boudreaux, C., Guedry, T. & Walker, D. 2003.** "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins", *Infection and immunity*, vol. 71, no. 5, pp. 2516-2524.
150. **Mehlhorn, H; Duwell, D; et al. 1994.** Manual de Parasitología Veterinaria. Colombia. Grass-Iatros. 284p.
151. **McBride, J.W., Corstvet, R-, Gaunt, S., Boudreaux, C., Guedry, T. & Walker, D., 2003.** "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins", *Infection and immunity*, vol. 71, n°. 5, pp. 2516-2524.
152. **Meneses, A. 1995.** First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *Vet. Rec.* 137:46-47
153. **Messick, J.B. & Rikihisa, Y. 1993.** "Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization, and proliferation in host cells by flow cytometry", *Infection and immunity*, vol. 61, no. 9, pp. 3803-3810.
154. **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", *Infect Immun*, vol. 62, no. 8, pp. 3156-61.
155. **Milano, S., Arcoleo, F., D'Agostino, P. & Cillari, E. 1997.** "Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 1, pp. 117-121.
156. **Moreira, S.; Bastos, C.; Araujo, R.; Santos, M. y Pasos, L. 2002.** Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, 50: 20-25.
157. **Moshkovskii, S.D. 1945.** "Cytotropic inducers of infection and the classification of the Rickettsiae with Clamydozoa", *Adv. Mod. Biol. (Moscow)*, vol. 19, pp. 1.
158. **Mott, J. & Rikihisa, Y. 2000.** "Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils", *Infection and immunity*, vol. 68, no. 12, pp. 6697-6703.

159. **Mott, J., Barnewall, R.E. & Rikihisa, Y. 1999.** "Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells", *Infection and immunity*, vol. 67, no. 3, pp. 1368-1378.
160. **Muñoz, J. & Geister, R. 1950.** "Inhibition of phagocytosis by aureomycin", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, vol. 75, no. 2, pp. 367-370.
161. **Murphy, G. L., S. A. Ewing, L. C. Whitworth, J. C. Fox, and A. A. Kocan. 1998.** A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79:325-339.
162. **Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S. & Kontos, V.S. 2004.** "Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases", *J Am Anim. Hosp. Assoc*, vol. 40, no. 3, pp. 174-84.
163. **Nandi, B., Chatterjee, M., Hogle, K., McLaughlin, M., MacNamara, K., Racine, R. & Winslow, G.M. 2009.** "Antigen display, T-cell activation, and immune evasion during acute and chronic ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 77, no. 10, pp. 4643-4653.
164. **Neer TM. 1995.** Unpublished data. Louisiana State University, Baton Rouge LA.
165. **Neer, T. 2000.** Ehrlichiosis monocítica y granulocítica caninas. En: G. E. Greene, ed. *Enfermedades infecciosas en perro y gatos*. Mc. Graw – Hill Interamericana México. p 153-162.
166. **Neer, T.M. & Harrus, S. 2006.** "Canine Monocytotropic Ehrlichiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, and *N. risticii* Infections). Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and *Wolbachia* Infection." in *Infectious Diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 203-217.
167. **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. American College of Veterinary Internal Medicine", *J Vet Intern Med*, vol. 16, no. 3, pp. 309-15.
168. **Neer, T.M., Eddlestone, S.M., Gaunt, S.D. & Corstvet, R.E. 1999.** "Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 501-504.
169. **Nelson R.W., Couto C.G. 1995.** *Medicina interna en animales pequeños*, Inter-médica. Buenos Aires. pp. 899- 902.

170. **Nganvongpanit, K., Pothacharoen, P., Suwankong, N., Ong-Chai, S. & Kongtawelert, P. 2009.** "The effect of doxycycline on canine hip osteoarthritis: design of a 6-months clinical trial", *Journal of veterinary science*, vol. 10, no. 3, pp. 239- 247.
171. **Nyindo MBA, Kakoma I, Hansen R. 1991.** Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of the protein immunoblot. *Am J Vet Res* 52:1225-1230
172. **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*, vol. 41, no. 2, pp. 250-254.
173. **Nyindo, M.B., Ristic, M., Huxsoll, D.L. & Smith, A.R. 1971.** "Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent *Ehrlichia canis*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 32, no. 11, pp. 1651-1658.
174. **O'Connor, T.P., Hanscom, J.L., Hegarty, B.C., Groat, R.G. & Breitschwerdt, E.B. 2006.** "Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 67, no. 2, pp. 206-210.
175. **O'Dell, J.R., Paulsen, G., Haire, C.E., Blakely, K., Palmer, W., Wees, S., Eckhoff, P.J., Klassen, L.W., Churchill, M., Doud, D., Weaver, A. & Moore, G.F. 1999.** "Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis with minocycline: four-year followup of a double-blind, placebo-controlled trial", *Arthritis and Rheumatism*, vol. 42, no. 8, pp. 1691- 1695.
176. **Otranto, D., de Caprariis, D., Lia, R.P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, S., Diniz, P.P., Mencke, N., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E., Capelli, G. & Stanneck, D. 2010.** "Prevention of endemic canine vectorborne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study", *Veterinary parasitology*, vol. 172, no. 3-4, pp. 323-332.
177. **Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., de Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G. & Stanneck, D. 2008.** "Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions", *Veterinary parasitology*, vol. 153, n°. 3-4, pp. 320-328.
178. **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*, vol. 59, no. 10, pp. 3418-3423.
179. **Parnell, N. 2004.** Ehrlichiosis canina. En Morgan, RV, ed. Clínica de Pequeños Animales. El SEVIER. España. p 1122-1124.

180. **Pasquale, T.R. & Tan, J.S. 2005.** "Nonantimicrobial effects of antibacterial agents", *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 40, no. 1, pp. 127-135.
181. **Patel, R.N., Attur, M.G., Dave, M.N., Patel, I.V., Stuchin, S.A., Abramson, S.B. & Amin, A.R. 1999.** "A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E2 production". *J. Imm.*, vol. 163, n°. 6, pp. 3459-67.
182. **Paulino Ruiz, A. 2011.** "Detección Serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia Chaffeensis* en humanos que realizan actividades veterinarias en Lima Metropolitana. Tesis, FMV, UNMSM.
183. **Pérez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., and Rikihisa Y., 2006.** Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1078: 110-117.
184. **Perez, M., Rikihisa, Y. & Wen, B. 1996.** "*Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization", *J Clin. Microbiol.* vol. 34, no. 9, pp. 2133-9.
185. **Philip, C.B., Hadlow, W.J. & Hughes, L.E. 1954.** "Studies on salmon poisoning disease of canines. I. The rickettsial relationships and pathogenicity of *Neorickettsia helmintheca*", *Experimental parasitology*, vol. 3, no. 4, pp. 336-350.
186. **Popov, V.; Violet C. Han; Chen, S.; Dumler, J.; Feng, T. Andreadst, T.; Tesh, R.; and Walker, D. 1998.** "Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*". *J. Med. Microbiol.* Vol. 47, 235 – 251.
187. **Price, J.E. & Dolan, T.T. 1980.** "A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis", *The Veterinary record*, vol. 107, no. 12, pp. 275-277.
188. **Quijada, J., García, M., Bethencourt A., Medina O., Vivas I., Pérez A., Garcia, H., 2012.** Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de Venezuela. *REDVET Rev. electron. vet.* Volumen 13 N° 8.
189. **Ramamurthy, N.S., Kucine, A.J., McClain, S.A., McNamara, T.F. & Golub, L.M. 1998a.** "Topically applied CMT-2 enhances wound healing in streptozotocin diabetic rat skin", *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 2, pp. 144- 148.
190. **Ramamurthy, N.S., Schroeder, K.L., McNamara, T.F., Gwinnett, A.J., Evans, R.T., Bosko, C. & Golub, L.M. 1998b.** "Root-surface caries in rats and humans: inhibition by a non-antimicrobial property of tetracyclines", *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 2, pp. 43-50.

191. **Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Flower, R.J. 2008a.** "Antibióticos" in *Farmacología*, eds. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter & R.J. Flower, Sexta edn, Elsevier, Barcelona, España, pp. 661-678.
192. **Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Flower, R.J. 2008b.** "Antiinflamatorios e inmunodepresores" in *Farmacología*, eds. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter & R.J. Flower, Sexta edn. Elsevier, Barcelona, España, pp. 226-247.
193. **Reardon, M.J. & Pierce, K.R. 1981a.** "Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems", *Veterinary pathology*, vol. 18, no. 1, pp. 48-61.
194. **Reardon, M.J. & Pierce, K.R. 1981b.** "Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs", *Veterinary pathology*, vol. 18, no. 3, pp. 384-395.
195. **Reddy, G.R. & Streck, C.P. 1999.** "Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent *Ehrlichia chaffeensis* suggests that it plays a role in immune evasion", *Molecular cell biology research communications: MCBRC*, vol. 1, no. 3, pp. 167-175.
196. **Rikihisa Y. 1991.** The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (3):286–308.
197. **Rikihisa, Y. 1999.** "Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*", *Microbes Infect*, vol. 1, no. 5, pp. 367-76.
198. **Rikihisa, Y. 2010.** "Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*", *Veterinary parasitology*, vol. 167, no. 2-4, pp. 155-166.
199. **Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Fox, J.C., Siregar, A.G., Pasaribu, F.H. & Malole, M.B. 1992.** "Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection", *Journal of clinical microbiology*, vol. 30, no. 1, pp. 143-148.
200. **Rikihisa, Y., Johnson, G.C. & Burger, C.J. 1987.** "Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with *Ehrlichia risticii*", *Infection and immunity*, vol. 55, no. 9, pp. 2215-2222.
201. **Rikihisa, Y., Ewing, S. & Fox, J. 1994.** "Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans", *J. Clin. Microbiol.* vol. 32, n° 9, pp. 2107-2112.
202. **Ristic, M., Huxsoll, D.L., Weisinger, R.M., Hilebrandt, P.K., & Nyindo, M.B., 1972.** "Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence", *Infect Immun.* vol. 6, n°3, pp. 226-31.

203. **Rivas V., Morales, D., Saenz, M., Bonilla, J. 2010.** *Hallazgo de Ehrlichiosis canina causada por E. canis en una Comunidad del Municipio de León, Nicaragua* REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria [en línea], 11 (Marzo-Sin mes) : [Fecha de consulta: 20 de febrero de 2014] .
204. **Rivero Eguez, María Virginia. 2008.** *Alteración de color en piezas dentarias de niños menores de 10 años. Facultad de Odontología.* ULEAM. Manta. 129 p.
205. **Riviere, J.E. & Spoo, J.W. 2001.** "Tetracycline antibiotics" in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, ed. H.R. Adams, Eighth edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, Estados Unidos, pp. 828-840.
206. **Rizzi, E., Castro, M.M., Prado, C.M., Silva, C.A., Fazan, R., Jr, Rossi, M.A., Tanus-Santos, J.E. & Gerlach, R.F. 2010.** "Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension", *Journal of cardiac failure*, vol. 16, no. 7, pp. 599-608.
207. **Roberts, M.C. 1996.** "Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution", *FEMS microbiology reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 1-24.
208. **Rodríguez-Vivas, R. I., R. E. F. Albornoz, and G. M. E. Bolio. 2005.** *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.* 127:75-79.
209. **Rojas, E. 2001.** (a) Las garrapatas IV (en línea). Consultado 19 feb. 2014. Disponible en: <http://www.webveterinaria.com/merial/Garrapatasiv.pdf>.
210. **Romero, L.E., Meneses, A.I., Salazar, L., Jiménez, M., Romero, J.J., Aguiar, D.M., Labruna, M.B., and Dolz G., 2011.** First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res. Vet. Sc.* 91:95-97.
211. **Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M. & Niedzwiecki, A. 2010.** "In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors", *Oncology reports*, vol. 23, no. 3, pp. 605-614.
212. **Sainz, A. 1996.** *Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb* (Tesis Doctoral). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
213. **Sainz, A., Amusatogui, I. & Tesouro, M.A. 1999.** "*Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain", *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, vol. 11, no. 4, pp. 382-384.

214. **Sainz, A., Kim, C.H., Tesouro, M.A., Hansen, R., Amusatogui, I., Koo, H.Y. & Kakoma, I. 2000a.** "Serological evidence of exposure to *Ehrlichia species* in dogs in Spain", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 916, pp. 635-642.
215. **Sainz, A., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Rodriguez, F., Mazzucchelli, F. & Rodriguez, M. 2000b.** "Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 134-139.
216. **Sainz, A.; Tesouro, M.A., and Amusatogui, I. 2000c.** Prospective comparative study of three treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. *J Vet Intern Med*; 14(2):134-139.
217. **San Miguel, S. Y. 2006.** Prevalencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la provincia de Sullana. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Alas Peruanas. p 51.
218. **Sauer, J.R.; Mane, S.D., and Smichmidt, S.P. 1986.** Molecular basis for salivary fluid secretion in ixodid ticks. In Sauer, J.R, Hair J.A (Eds): *Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks*. Chichester, England, Ellis Horwood.
219. **Schaefer, J.J., Needham, G.R., Bremer, W.G., Rikihisa, Y., Ewing, S.A. & Stich, R.W. 2007.** "Tick acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 9, pp. 3394-3396.
220. **Schwarz S and Chaslus Dancla E. 2001.** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanism if resistance. *Vet Res*;32: 201-225.
221. **Seedor, J.A., Perry, H.D., McNamara, T.F., Golub, L.M., Buxton, D.F. & Guthrie, D.S. 1987.** "Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits", *Archives of Ophthalmology*, vol. 105, no. 2, pp. 268-271.
222. **Seftor, E.A., Seftor, R.E., Nieva, D.R. & Hendrix, M.J. 1998a.** "Application of chemically modified tetracyclines (CMTs) in experimental models of cancer and arthritis", *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 2, pp. 103-110.
223. **Seftor, R.E., Seftor, E.A., De Larco, J.E., Kleiner, D.E., Leferson, J., Stetler-Stevenson, W.G., McNamara, T.F., Golub, L.M. & Hendrix, M.J. 1998b.** "Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis", *Clinical & experimental metastasis*, vol. 16, no. 3, pp. 217-225.
224. **Shaw D.H., Rubin S.I. 1986.** Pharmacologic activity of doxycycline. *Journal of American Veterinary Medical Association*, p 189, 808-809.

225. **Smith, R.D., Ristic, M., Huxsoll, D.L. & Baylor, R.A. 1975.** "Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia", *Infection and immunity*, vol. 11, no. 6, pp. 1216-1221.
226. **Sodikoff, C.** Pruebas diagnósticas y de laboratorio en pequeños animals. Ed. Harcourt, 1996. P.3998.
227. **Speer, B.S., Shoemaker, N.B. & Salyers, A.A. 1992.** "Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance", *Clinical microbiology reviews*, vol. 5, no. 4, pp. 387-399.
228. **Stevenson, H.L., Jordan, J.M., Peerwani, Z., Wang, H.Q., Walker, D.H. & Ismail, N. 2006.** "An intradermal environment promotes a protective type-1 response against lethal systemic monocytotropic ehrlichial infection", *Infection and immunity*, vol. 74, no. 8, pp. 4856-4864.
229. **Stiles, J. 2000,** "Canine rickettsial infections", *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*, vol. 30, n° 5, pp. 1135-1149.
230. **Sun, W., IJdo, J.W., Telford, S.R., 3rd, Hodzic, E., Zhang, Y., Barthold, S.W. & Fikrig, E. 1997.** "Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model", *The Journal of clinical investigation*, vol. 100, no. 12, pp. 3014-3018.
231. **Suomalainen, K., Sorsa, T., Golub, L.M., Ramamurthy, N., Lee, H.M., Uitto, V.J., Saari, H. & Konttinen, Y.T. 1992.** "Specificity of the anticollagenase action of tetracyclines: relevance to their anti-inflammatory potential", *Antimicrob. Agents Chemother*, vol.36, no. 1, pp. 227-9.
232. **Tami, I.; Martínez, J.; Tami, M.; Redondo, M.; Finol, H. y Simonovis, N. 1996.** Identificación of *Ehrlichia* species in blood smear. *J. Infect. Dist.*, 5: 19-23.
233. **Tatchell, R.J.1967.** "A modified method for obtaining tick oral secretion. *Journal Parasitology*, n°53: 1106-1107.
234. **Tatchell, R.J. 1969.** The ionic regulatory role of the salivary secretions of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Journal of Inse. Ct. Physiology*. 15:1421.
235. **Tauber, S.C. & Nau, R. 2008.** "Immunomodulatory properties of antibiotics", *Current molecular pharmacology*, vol. 1, no. 1, pp. 68-79.
236. **Taylor, D.E. & Chau, A. 1996.** "Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 1, pp. 1-5.
237. **Thirumalapura, N.R., Stevenson, H.L., Walker, D.H. & Ismail, N. 2008.** "Protective heterologous immunity against fatal ehrlichiosis and lack of protection following homologous challenge", *Infection and immunity*, vol. 76, no. 5, pp. 1920-1930.

238. **Thong, Y.H. & Ferrante, A. 1979.** "Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses by tetracycline analogues", *Clinical and experimental immunology*, vol. 35, no. 3, pp. 443-446.
239. **Thong, Y.H. & Ferrante, A. 1980.** "Effect of tetracycline treatment on immunological responses in mice", *Clinical and experimental immunology*, vol. 39, no. 3, pp. 728-732.
240. **Tilley, B.C., Alarcon, G.S., Heyse, S.P., Trentham, D.E., Neuner, R., Kaplan, D.A., Clegg, D.O., Leisen, J.C., Buckley, L., Cooper, S.M., Duncan, H., Pillemer, S.R., Tuttleman, M. & Fowler, S.E. 1995.** "Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, double-blind, placebo-controlled trial. MIRA Trial Group", *Annals of Internal Medicine*, vol. 122, no. 2, pp. 81-89. Tizard, I.R. 2009a, "Acquired immunity to bacteria and fungi" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 286-296.
241. **Tizard, I.R. 2009a.** "Acquired immunity to bacteria and fungi" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 286-296.
242. **Tizard, I.R. 2009b.** "Macrophages and the later stages of inflammation" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 41-56.
243. **Tizard, I.R. 2009c.** "Neutrophils and their products" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 28-40.
244. **Troy G.C.; Forrester S.D. 1990.** Canine ehrlichiosis, En: *Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat.* W.B. Saunders Company. Philadelphia pp 404-418.
245. **Unver, A., Huang, H. & Rikihisa, Y. 2006.** "Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1078, pp. 482-486.
246. **Vachier, N., Trap, I., Totte, P., Martinez, D. & Bensaid, A. 1998.** "Inhibition of MHC class I and class II cell surface expression on bovine endothelial cells upon infection with *Cowdria ruminantium*", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 61, no. 1, pp. 37-48.
247. **Van den Bogert, C. & Kroon, A.M. 1982.** "Effects of oxytetracycline on in vivo proliferation and differentiation of erythroid and lymphoid cells in the rat", *Clinical and experimental immunology*, vol. 50, no. 2, pp. 327-335.
248. **van Heeckeren, A.M., Rikihisa, Y., Park, J. & Fertel, R. 1993.** "Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, interleukin-6, and prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophages infected with *Ehrlichia risticii*", *Infection and immunity*, vol. 61, no. 10, pp. 4333-4337.

249. **Van Heerden J., Immelman A. 1979.** Tite use of doxycycline in the treatment of canine Ehrlichiosis. *Journal of South African Veterinary Association*, p 50, 241-244.
250. **Vásquez, R. et al. 1999.** *Parasitología veterinaria*. Madrid, ES., McGraw-Hill-Interamericana. p. 711-713.
251. **Walker, D.H., Ismail, N., Olano, J.P., McBride, J.W., Yu, X.J. & Feng, H.M. 2004.** "*Ehrlichia chaffeensis*: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen", *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, vol. 115, pp. 375-82; discussion 382-4.
252. **Walser-Reinhardt, L., Schaarschmidt-Kiener, D., Forster, J., Spiess, Bernhard M, 2012.** *Direct detection of Ehrlichia canis by PCR in the conjunctiva of a dog with bilateral anterior uveitis. Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 154(4):149-152, <http://dx.doi.org/10.1024/0036-7281/a000318>.*
253. **Waner, T., Harrus, S., 2000.** Ehrlichiosis monocítica canina. En: Carmichael, L., ed. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
254. **Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A. & Cornelissen, A.W. 2001.** "Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*", *Vet Parasitol*, vol. 95, no. 1, pp. 1-15.
255. **Waner, T., Harrus, S., Weiss, D.J., Bark, H. & Keysary, A. 1995.** "Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis", *Vet Immunol. Immunopathol.* vol. 48, no. 1-2, pp. 177-82.
256. **Waner, T., Leykin, I., Shinitsky, M., Sharabani, E., Buch, H., Keysary, A., Bark, H. & Harrus, S. 2000a.** "Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*", *Vet. Immunol. Immunopathol.* vol. 77, no. 1-2, pp. 145-50.
257. **Waner, T., Strenger, C. & Keysary, A. 2000b.** "Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs", *J Vet. Diagn. Invest.* vol. 12, n°. 3, pp. 240-4.
258. **Weisiger, R.M., Ristic, M. & Huxsoll, D.L. 1975.** "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 36, no. 5, pp. 689-694.
259. **Welch, W.D., Davis, D. & Thrupp, L.D. 1981.** "Effect of antimicrobial agents on human polymorphonuclear leukocyte microbicidal function", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 20, no. 1, pp. 15-20.

260. **Whist, S.K., Storset, A.K., Johansen, G.M. & Larsen, H.J. 2003.** "Modulation of leukocyte populations and immune responses in sheep experimentally infected with *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) *phagocytophilum*", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 94, no. 3-4, pp. 163-75.
261. **Wilson, R.C., Kemp, D.T., Kitzman, J.V. & Goetsch, D.D. 1988.** "Pharmacokinetics of doxycycline in dogs", *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, vol. 52, no. 1, pp. 12-14.
262. **Winslow, G.M., Yager, E., Shilo, K., Volk, E., Reilly, A. & Chu, F.K. 2000.** "Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection", *Infect Immun*, vol. 68, no. 4, pp. 2187-95.
263. **Woldehiwet, Z. 1987a.** "Depression of lymphocyte response to mitogens in sheep infected with tick-borne fever", *Journal of comparative pathology*, vol. 97, no. 6, pp. 637-643.
264. **Woldehiwet, Z. 1987b.** "The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep", *Journal of comparative pathology*, vol. 97, no. 4, pp. 481-485.
265. **Woldehiwet, Z. 1991.** "Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever", *Research in veterinary science*, vol. 51, no. 1, pp. 40-43.
266. **Wong, S.J. & Thomas, J.A. 1998.** "Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients", *Journal of clinical microbiology*, vol. 36, no. 7, pp. 1959-1963.
267. **Woody, B.J. & Hoskins, J.D. 1991.** "Ehrlichial diseases of dogs", *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, vol. 21, no. 1, pp. 75-98.
268. **Yager, E., Bitsaktsis, C., Nandi, B., McBride, J.W. & Winslow, G. 2005.** "Essential role for humoral immunity during *Ehrlichia infection* in immunocompetent mice", *Infect Immun*, vol. 73, no. 12, pp. 8009-16.
269. **Yoshiie, K., Kim, H.Y., Mott, J. & Rikihisa, Y. 2000.** "Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis", *Infection and immunity*, vol. 68, no. 3, pp. 1125-1133.
270. **Zanjani, T.M., Sabetkasaei, M., Mosaffa, N., Manaheji, H., Labibi, F. & Farokhi, B. 2006.** "Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain", *European journal of pharmacology*, vol. 538, no. 1-3, pp. 66-72.
271. **Zhang, J.Z., Sinha, M., Luxon, B.A. & Yu, X.J. 2004.** "Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles", *Infection and immunity*, vol. 72, no. 1, pp. 498-507.

272. **Zhang, Y., Ohashi, N., Lee, E. H., Tamura, A. & Rikihisa, Y. 1997.** *Ehrlichia sennetsu groE operon and antigenic properties of the GroEL homolog. FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18, 39-46.