

Inclusiones parasitarias compatibles con *Ehrlichia spp.* y *Hepatozoon canis* concomitantes en un neutrófilo

La publicación de este artículo surgió de una singularidad y casualidad laboratorial, en la que encontramos una *Ehrlichia* y un *Hepatozoon* en el mismo neutrófilo.

Hemos querido destacar el conocimiento que debemos tener para interpretar correctamente los resultados de las serologías de *Ehrlichia*; porque con un resultado negativo de una única especie no podemos descartar que nuestro paciente esté cursando la enfermedad.

Palabras clave: Perro. Ehrlichiosis canina. Hepatozoonosis canina.
Rev. AVEPA, 24(3):149-153, 2004

Introducción

J. M. Mora, E. Pérez,
Ll. Galmes.

Serveis Veterinaris
Baix Llobregat.
Dr. Barraquer, 27
08750 Molins de Rei
Barcelona.



La ehrlichiosis canina es una enfermedad muy común en nuestro país que ha sido muy bien descrita y estudiada desde el punto de vista patogénico y de sintomatología clínica. En cambio, existe cierta dificultad en su diagnóstico final debido a que es muy difícil encontrar el parásito en un frotis sanguíneo, siendo necesario conocer bien las limitaciones y ventajas de las diferentes pruebas laboratoriales disponibles en el mercado para poder interpretarlas correctamente.

La hepatozoonosis es una enfermedad cosmopolita¹ de la cual se han identificado dos agentes etiológicos²: *Hepatozoon americanum* (típico de Estados Unidos y del que su huésped definitivo es *Amblyomma maculatum*) y *H. canis* (identificado en Europa, considerado apatógeno, siendo su hospedador definitivo *Rhipicephalus sanguineus*).

En la clínica podemos tener perros a los que diagnosticamos citológicamente una ehrlichiosis, una hepatozoonosis o ambas simultáneamente. En este artículo pretendemos comentar la tercera posibilidad, ya que mediante un frotis sanguíneo se detectó en un mismo neutrófilo, una mórula de *Ehrlichia* y un gametocito de *H. canis*.

Caso clínico

Se presentó en nuestro centro veterinario una Cocker hembra, no castrada, de 5 años de edad y 12.8 Kg de peso. El propietario la trajo a Barcelona desde Tenerife unos 4 meses antes. Se le había diagnosticado Filariasis en la isla y se estaba tratando con Ivermectina. La causa de su consulta fue que la perra parió 15 días antes 6 cachorros, de los cuales 4 nacieron muertos y desde entonces perdía peso progresivamente, mostrándose apática y anoréxica.

En el examen físico se encontró una temperatura de 40.4°C, mucosas pálidas, apatía, letargia, dificultad respiratoria, otitis bacteriana, 5% de deshidratación, sangre digerida en heces y algunas garrapatas, por lo que se decidió hacer las siguientes pruebas diagnósticas:

- **Hemograma A** (Tabla 1). La anemia era no regenerativa normocrómica y normocítica. En el recuento diferencial se vio que la leucopenia era básicamente producida por una neutropenia muy marcada.
- **Bioquímicas séricas** (Tabla 2).
- **Urianálisis**. En el sedimento no se detectó ningún hallazgo interesante. La densidad urinaria era de 1.020 y en la tira todos los parámetros eran normales. (Combur Test.Roche).

- **Estudio radiológico de abdomen simple:** se detectó un cuerpo extraño metálico en el interior del estómago.
- **Citología vaginal:** compatible con anestro.
- **Proteinograma** (Tabla 3)

	RESULTADOS (A)	RESULTADOS (B)	RESULTADOS (C)
HCTO	23 %	26 %	31 %
HGB	7.2 g/dL	9.3 g/dL	10.8 g/dL
MCHC	35.8 g/dL	35.5 g/dL	35.1 g/dL
WBC	1.8 x 10 ⁹ /L	17.7 x 10 /L	16.5 x 10 ⁹ /L
Segmentados	1345/mm ³	5841/mm ³	-
Eosinófilos	16/mm ³	1239/mm ³	-
Basófilos	0	0	-
Cayados	339/mm ³	7080/mm ³	-
Monocitos	66/mm ³	2832/mm ³	-
Linfocitos	34/mm ³	708/mm ³	-
PLT	219 x 10 ⁹ /L	165 x 10 /L	470 x 10 ⁹ /L
RETICS	0%	-	-

(A) Realizado el 17.04.2002 - (B) Realizado el 16.05.2002
(C) Realizado el 10.09.2002

Tabla 1. Valores del hemograma .

Prueba	Resultados	Rango de Referencia
ALT	236 U/L	10-100
GLU	123.6 mg/dl	77-125
Cl	119.3 mmol/l	109-122
K	4.93 mmol/l	3.5-5.8
Na	Hipernatremia	140-155
CREA	0.61 mg/dl	0.5-1.8
ALB	2.14 g/dl	2.7-3.8
AST	152 U/L	0-50
PT	59 g/l	52-76
Ca	8.96 mg/dl	7.9-12
GGT	0 mg/dl	0-7

Tabla 2. Bioquímicas séricas

Inicialmente, se planteó realizar una gastrotomía, pero se decidió hospitalizarla para estabilizarla primero iniciando un tratamiento médico con Fluidoterapia, Metronidazol (10mg/Kg/12h/VO) Ácido ursodeoxicólico (15mg/Kg/24 h/1mes) y Amoxicilina (20mg/Kg/12 h/VO). Una vez rehidratada y estabilizada se fue a casa continuando el tratamiento médico y con instrucciones para controlar exhaustivamente el cuerpo extraño metálico, la funcionalidad renal y la evolución general.

	Resultado	Valor de Referencia
Proteínas totales	59 g/L	52-76
Albumina	20.1 g/l	25.4-40.6
Globulinas totales	39 g/l	20.6-50.6
Alfa-1-Globulinas	1.5 g/l	1.3-4.5
ALFA-2-Globulinas	11.2 g/l	4.6-9.9
B6-Globulinas	20.4 g/l	13.5-23.5
Gamma-Globulinas	5.9 g/l	1.2-20
Cociente A/G	0.5	0.7-1.9

Tabla 2. Proteinograma

Tras 9 días de tratamiento, el propietario vino a la clínica porque el estado del animal no había mejorado, presentando en la exploración física hemorragia vaginal, temperatura de 40°C, mucosas pálidas, tiempo de relleno capilar >2 sg.

Repetimos algunas pruebas diagnósticas obteniéndose los siguientes resultados:

- **Rx abdomen:** el cuerpo extraño había sido eliminado.
- **Análisis de sangre:** Hcto: 17%(37-55)/PT6.5g/l(5.2-7.6)/Crea0.99mg/dl(0.5-1.8)
- **Urianálisis:** la densidad urinaria era 1.013. En la tira (Combur Test. Roche) se detectó proteinuria (500mg/dl) y hemoglobinuria.

Por la evolución del paciente y el resultado de las últimas pruebas sospechamos la existencia de alguna parasitosis hemática y decidimos cursar las siguientes pruebas diagnósticas:

- **Serología ELISA anti-*Dirofilaria immitis*:** Negativo
- **Test ELISA *Leishmania*:** Negativo
- **Citología de médula ósea:** Hiperplasia moderada de la línea granulocítica.
- **Frotis de sangre:** se observó una mórula de Ehrlichia en un neutrófilo incluyendo en el mismo una cápsula de *Hepatozoon canis*. (Figura 1)

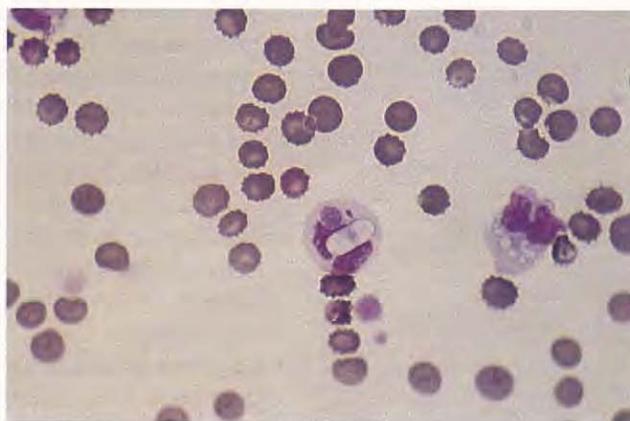


Figura 1. Frotis sanguíneo en el que se aprecia una mórula de *Ehrlichia* y un gametocito de *Hepatozoon canis* en un neutrófilo.

Habiendo llegado al diagnóstico, decidimos por interés clínico enviar muestra al laboratorio para determinar la titulación de *Ehrlichia canis*, obteniéndose un resultado de 1/80 mediante la técnica IFI (Inmunofluorescencia indirecta).

Se instauró un nuevo tratamiento a base de doxiciclina (10mg/Kg/24h/VO/28días), dipropionato de imidocarb (5 mg/kg/SC) y atropina (0.5mg IM), repitiendo la administración de estos dos últimos fármacos a los 15 días. Además, se decidió retirar el tratamiento filaricida.

En cuanto a la evolución, 20 días después de iniciado el tratamiento se hizo un hemograma (Hemograma B) de control, habiendo aumentado el hematocrito a 26% y presentando una evolución favorable. Cuatro meses más tarde el hematocrito había llegado a 31%. (Hemograma C) (Tabla 1). A los 6 meses de la primera visita el hematocrito se había estabilizado en un 31%, su estado general era óptimo, estaba alegre y había quedado gestante.

Diez meses más tarde de la primera serología, repetimos las serologías postratamiento de *E.canis*, *A.phagocytophilum* y *N.risticii* dándonos positivo solamente a *E.canis* con un título superior a 1/40 y negativo a las otras dos. También se hizo una PCR de género con el fin de detectar los tres (género *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*) siendo el resultado negativo.

Discusión

El diagnóstico definitivo de ehrlichiosis canina puede llevarse a cabo visualizando las mórulas en el frotis sanguíneo, si bien éstas sólo suelen ser visibles las dos primeras semanas postinfección y están en cantidades bastante despreciables^{3,4}. Por ello se trabaja con pruebas serológicas (IFI o ELISA) de las que hay que conocer sus limitaciones; podemos obtener resultados falsos negativos si solicitamos pruebas serológicas de especies de *Ehrlichia* diferentes a la que nos está provocando la enfermedad (hay que tener en cuenta que muchas de estas serologías están hechas con cultivos de *Ehrlichia* de otros países).

Además, estas serologías muchas veces no permiten llegar al diagnóstico específico definitivo final debido a la existencia de reacciones serológicas cruzadas, existiendo contradicciones en la bibliografía consultada^{3,5-8} en cuanto a cuales son las reacciones cruzadas entre las diferentes especies.

Es importante conocer la nueva clasificación del género *Ehrlichia* junto a otros géneros estrechamente relacionados que ha sido sugerida⁹, las especies del genogrupo *E.phagocytophila* (*E.phagocytophila*, *E.equi*, *E.platys* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH)) son consideradas miembros del género *Anaplasma*, las del genogrupo *E.sennetsu* son ahora miembros del género *Neorickettsia* (*E.risticii*, *E.sennetsu* y *Neorickettsia helminthoeca*) y el género *Ehrlichia* incluye las especies del genogrupo *E.canis* (*E.canis*, *E.ewingii*, *E.chaffeensis*, *E.muris* y *Cowdria ruminantum*).

Debemos tener en cuenta, al solicitar las pruebas serológicas; que *E.canis* es la especie de *Ehrlichia* más frecuentemente encontrada⁶, seguida por *A.platys* y *A.phagocytophi-*

lum posteriormente. En zonas húmedas podrían darse infecciones por *Neorickettsia risticii* porque se transmite por ingestión de babosas o insectos acuáticos; se han encontrado algunos casos en nuestro país con serologías positivas frente a *N.risticii* y negativas frente *E.canis*⁶, aunque hay pocos casos clínicos descritos.

No podemos asegurar que un paciente no tenga anticuerpos frente a los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* hasta que hayamos hecho todas las serologías. Tampoco podemos descartar una ehrlichiosis por un título serológico negativo de una única especie, por lo que si el cuadro de nuestro paciente es muy sugestivo de ehrlichiosis puede ser correcto iniciar el tratamiento para esta enfermedad.

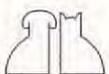
En casos de infección experimental con *E.canis* se ha comprobado que la producción de anticuerpos empezaba 7 días tras la infección inicial⁴ y en algunos casos no se habían producido anticuerpos hasta 28 días tras la infección^{7,10}, de forma que en los casos agudos con sospecha de ehrlichiosis y con un título negativo no podemos excluir esta enfermedad. Entonces, si la sospecha de ehrlichiosis es muy importante deben repetirse las pruebas 2-3 semanas más tarde para comprobar si hay seroconversión^{7,8}. También hay que tener en cuenta muchos casos de perros expuestos y que han desarrollado seroconversión pero nunca muestran signos clínicos⁷.

Cada vez se está trabajando más con técnicas moleculares, las cuales han permitido últimamente diferenciar algunas especies de *Ehrlichia* y conocer mejor la morbilidad de algunos agentes etiológicos⁸. Se está recurriendo, para complementar las pruebas serológicas, a técnicas más específicas como la PCR, aunque también hay que conocer sus limitaciones. La PCR es un método sensible para la detección de una infección aguda por *E.canis* o una especie granulocítica de *Ehrlichia*. Un resultado positivo por PCR confirma infección por *Ehrlichia* en los casos que la serología sólo te indica exposición⁷. La PCR y la secuenciación del DNA han sido usados para identificar nuevas especies o para mostrar que algunas especies de *Ehrlichia* como HGE, *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma equi* están estrechamente relacionadas. Los primers o cebadores pueden ser diseñados para detectar la secuencia de algunos genes comunes a todas las especies de *Ehrlichia* o para identificar especies individuales.

Hay limitaciones potenciales en el uso de la PCR en la práctica diaria; las muestras han de enviarse a un laboratorio externo y son relativamente caras, la especificidad del PCR es en base al diseño del primer y normalmente no hay estandarización entre laboratorios; dificultando la comparación de resultados. La sensibilidad en animales con infección natural es desconocida. Algunos autores empiezan a dudar si fragmentos de agentes muertos pueden dar resultados PCR positivos. El PCR debería ser utilizado en combinación con la serología, y no en lugar de ella para el diagnóstico inicial de ehrlichiosis en animales no tratados⁷. La serología sigue siendo la prueba de referencia o *gold standard*⁸.

E.canis y *E.chaffeensis* son clínica y serológicamente indistinguibles³, pero mediante Western blot podemos distinguir entre *E.canis* y *E.chaffeensis* y entre *E.canis* y *E.ewingii*⁷.

En nuestro caso (a pesar de tener una serología positiva



frente a *E.canis*) inicialmente no pensábamos que se tratara de *E.canis* porque normalmente, no se encuentra en un neutrófilo a no ser que nos encontráramos ante una excepción. Beaufils y colaboradores¹⁰ comentan la posibilidad de que *Hepatozoon canis* favorezca la penetración de *E.canis* en el interior del neutrófilo.

No creemos que se trate de *Anaplasma platys* porque, normalmente, está dentro de plaquetas y entre *A.platys* y *E.canis* es más difícil que existan reacciones serológicas cruzadas^{3,11}.

Al encontrarse la mórula en una célula polimorfonuclear, clasificamos la enfermedad como "Ehrlichiosis granulocítica canina"; los agentes causales de ésta son *E.ewingii* y las tres especies granulocíticas del género *Anaplasma* consideradas el mismo agente. El vector de transmisión de *E.ewingii* es *Amblyomma americanum*^{9,12} (esta garrapata es difícil encontrarla en nuestro país porque es típica de los EEUU); de todas formas, se han hecho estudios serológicos en nuestro país¹¹ en los que se obtenían resultados positivos a *E.ewingii* (creemos que, seguramente, se deba a una reacción serológica cruzada con *E.canis*, a no ser que actualmente las garrapatas presentes en nuestro país estén transmitiendo también *E.ewingii*).

La garrapata que transmite *Anaplasma phagocytophilum* es *Ixodes scapularis* (de distribución cosmopolita), en regiones endémicas (Europa), *I.scapularis*, *I.pacificus* o *I.ricinus* transmiten las especies del género *Anaplasma*³ a gatos, perros, rumiantes y al ser humano⁸. Estudios de seroprevalencia y PCR han puesto de manifiesto la presencia de especies del género *Anaplasma* en rumiantes, especialmente en el País Vasco. Asimismo, se han detectado algunos perros seropositivos en la zona centro de España¹⁴.

Por el resultado que obtuvimos de las serologías en el que ambas fueron positivas a *E.canis* creemos que el agente encontrado sea próximo a *E.canis* (probablemente *E.canis*, si bien no se puede descartar *E.chafeensis* o *E.ewingii*). El hecho que la serología frente a *A.phagocytophilum* nos diera negativo, hace que el grado de sospecha de infección por este agente sea menor.

El resultado negativo de la PCR 10 meses después del tratamiento es comprensible porque nuestro paciente estaba sano y, seguramente, se había eliminado el parásito con el tratamiento. Como explicamos anteriormente la PCR debe usarse en casos agudos y en animales no tratados.

Si la sintomatología no se resuelve en 7 días tras el inicio del tratamiento se deben considerar otros diagnósticos¹⁵ o concurrencia con otras enfermedades. En nuestro entorno geográfico, deben descartarse especialmente concurrencias

con leishmaniosis canina o con infecciones causadas por otros agentes transmitidos por garrapatas como *Rickettsia spp*¹³, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*¹⁶ o *Hepatozoon spp*. La infección con uno de estos agentes puede causar manifestaciones clínicas y hematológicas indistinguibles entre ellos⁸.

El American College of Veterinary Internal Medicine recomienda monitorizar los animales tratados hasta que se solucione la trombocitopenia y la hiperglobulinemia⁷.

Referente al otro parásito que identificamos en la muestra (*Hepatozoon canis*), tiempo atrás se consideraba que algunos de estos parásitos, en algunos hospedadores y en ciertas localizaciones geográficas actuaban provocando sintomatología clara en el animal y en otros cursaba de forma asintomática. Estudios realizados en 1997 clasificaron el parásito que provoca la enfermedad como otra especie diferente (*Hepatozoon americanum*)¹⁷. Ésta fue identificada en EE.UU y se ha demostrado que actúa en perros de ese país dando una sintomatología característica y definida, grave en ciertos casos. Otros estudios paralelos realizados fuera de los EE.UU (África, Japón, Israel¹⁸) concluyen que *H.canis* se considera apatógeno salvo en casos de inmunosupresión o existencia de una enfermedad primaria que comprometa gravemente la salud del hospedador.

El diagnóstico definitivo exige identificar el microorganismo. En la preparación del frotis; los gametocitos pueden abandonar la célula del huésped después de extraer la sangre y dejar tras de sí una cápsula vacía difícil de observar² sobre el fondo blanco de la preparación, sobretodo si la muestra no se prepara inmediatamente tras la extracción de sangre²⁰. Algunos autores²⁰ han cuantificado las probabilidades de encontrar una célula parasitada con la cápsula de *H. Canis* afirmando que en caso de que el animal presente parasitemia se encontrarán parasitados entre 1 y 2 leucocitos por cada 1000 que se encuentren circulantes.

Según los datos aportados y por nuestra experiencia podemos pensar que *H. canis*, que de las dos especies de *Hepatozoon* que existen, es la que actúa en nuestro país, es fundamentalmente apatógena salvo en los casos en que la inmunidad del hospedador se encuentre gravemente comprometida.

Agradecimientos

A Ángel Sainz por su supervisión y ayuda en la elaboración del artículo y a Ignacio Moral por el cariño transmitido hacia la medicina.

Title

Concomitant parasite inclusions compatible with *Ehrlichia* spp. and *Hepatozoon canis* in a neutrophil

Summary

In this article we describe the clinical case of a 5-year-old Cocker that arrived to our practice with symptomatology compatible with ehrlichiosis. We detected the presence of an *Ehrlichia morulae* and a *Hepatozoon canis* gametocyte in the same neutrophil. The dog responds successfully to the treatment based on doxycycline, imidocarb dipropionate and atropine.

In the last taxonomic reorganization the genus *Ehrlichia* was divided in three; genus *Anaplasma*, genus *Neorickettsia* and genus *Ehrlichia*. This enforces the fact that the veterinarian clinician must be acquainted with the most frequent forms of *Ehrlichia* in the area, the specific symptomatology pertaining and the laboratory findings characteristic of each type in order to attain a correct final etiological diagnosis of ehrlichiosis.

The most widely used method for the diagnosis of ehrlichiosis is the serology (amongst other laboratory tests), being it absolutely necessary to acknowledge the limitations and benefits because it can lead to diagnosing false negatives. Moreover, it is difficult to assess with precision which species has caused the illness due to the frequent serological cross reactions between some phylogenetically close species. Therefore, in order to define which *Ehrlichia* species is responsible for the correspondent infection, the aid of molecular diagnostic testing can be sought for.

Key words: Dog. Canine Ehrlichiosis. Canine Hepatozoonosis.

Bibliografía

- Gosset A., Gaunt D., Aja S.: Hepatozoonosis and Ehrlichiosis in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1985; Mar/April, vol. 21: 265-267.
- Macintire DK, Johnson NV: Canine Hepatozoonosis. En Kirk XIII: *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*, McGraw-Hill Interamericana, 2001; 331-334.
- Ettinger SJ, Feldman EC: En *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*, 5ª Ed, Intermedica, 2002; 443-451.
- Font J, Cairó J, Callés A: Ehrlichiosis canina. *Clinica Veterinaria de pequeños animales*, 1988, 8:141-148.
- Greig B: Ehrlichiosis granulocítica. En Kirk XIII: *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*, McGraw-Hill Interamericana, 2001; 318-320.
- Sainz A, Amusatogui I, Kakoma I, Rodríguez F, Tesouro MA: Estudio sobre la presencia de anticuerpos frente a diferentes especies de *Ehrlichia* spp. en perros de la zona centro de España. XXXV Congreso nacional de AVEPA 2000; 338.
- Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, and Lappin MR: Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *J Vet Intern Med* 2002; 16:309-315.
- Warner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AWCA. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology* 95 (2001) 1-15.
- Sainz A: Clinical and therapeutic aspects of canine ehrlichiosis. XXVII WSAVA CONGRESS, 2002; 280-281.
- Beaufils J.P., Legroux J.P.: Simultaneous presence of *Ehrlichia* sp and *hepatozoon canis* in dog granulocytes: about two cases. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1992; 27(1): 81-86.
- Breitschwerdt EB: Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades caninas transmitidas por garrapatas. En Kirk XI: *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*, McGraw-Hill Interamericana, 1994; 280-284.
- Ewing S.A.: Garrapatas como vectores de enfermedades en animales de compañía. En Kirk XIII: *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*, McGraw-Hill Interamericana, 2001; 315-318.
- Morales MJ, Mateu C, Guitart P: Seroprevalencia de Ehrlichiosis y Rickettsiosis. XXXV Congreso nacional de AVEPA 2000; 340.
- Amusatogui I, Sainz A, Tesouro MA: Seroprevalencia de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* y *Ehrlichia risticii* en perros de Galicia. XXXVI Congreso nacional de AVEPA 2001; 314.
- Lappin MR: Canine Ehrlichiosis. In Nelson Couto Small Animal Internal Medicine, Third Edition, 2003; 1267-1272.
- Pimenta P, Pastor J, Roura X, Segura D, Castella J y Cuenca R: Anemia hemolítica aguda causada por *Babesia gibsoni*. Descripción de dos casos clínicos. XXXV Congreso Nacional de AVEPA 2000; 336.
- Vincent-Johnson N, Macintire D, Lindsay D, et al: A new hepatozoon species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *J Parasitol* 1997; 83:1165.
- Elias E, Homans PA: Hepatozoon canis infection in dogs: Clinical and hematological findings-treatment. *J Small Anim Pract* 1988;29:55
- Craig TM: Hepatozoonosis. In Greene (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, WB Saunders, 1990; 778-785.
- Rick L, Cowell, Ronald D, Tyler, James H, Meinkoth: En *Citología y Hematología Diagnóstica en el Perro y el Gato*. 2ª Ed.
- Inokuma H, Ohno K and Yamamoto S: Serosurvey of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J Vet. Med. Sci.* 1999; 61(10): 1153-1155.
- Shaw S, Kenny M, Day M, Birtles R, Holden D, German A, Craven M, Chandler M, Garosi L: Canine granulocytic ehrlichiosis in the UK. *Veterinary Record* 2001; June 9: 727-728.
- Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI: Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36, 9, 2645-2651.
- Pascual M, Amusatogui I, Sainz A, Tesouro MA: Cuadro clínico compatible con Ehrlichiosis en un perro positivo a *E. risticii*. XXXVI Congreso Nacional de AVEPA; 310.
- Leiva M, Peña T, Naranjo C: Ehrlichiosis ocular canina(1999-2002) . XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA 2003; 331.
- Aguirre E, Sainz A, Amusatogui I, Rodríguez F, Tesouro MA: Estudio serológico de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophila* y *Neorickettsia risticii* en perros residentes en colectividades de Madrid. XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA 2003;281.
- Aguirre E, Tesouro MA, Amusatogui I, Sainz A: Comparación de diferentes protocolos de PCR para la detección de *Ehrlichia canis* en el perro. XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA 2003;283.
- Prieto M: Estudio de la analítica sanguínea en perros con Babesiosis e influencia de la infección simultánea por *Ehrlichia* y *Borrelia*. XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA 2003; 285.
- Prieto M: Aspectos clínicos de la Babesiosis canina y de la infección simultánea por *Ehrlichia* y *Borrelia*. XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA 2003; 286.