

**Comparación entre las técnicas ELISA e inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos (IgG) contra *Ehrlichia* spp en dos albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia**

**Trabajo de grado para optar por el título de Médica Veterinaria**

**Mariana Machado Arango**

**Asesor**

**MVZ, M.Sc, Dr. Sc.(c) Santiago Monsalve Buriticá**

**Corporación Universitaria Lasallista**

**Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias**

**Programa de Medicina Veterinaria**

**Caldas -Antioquia**

**2018**

## Contenido

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Justificación.....	7
Marco teórico .....	8
Objetivos .....	15
Metodología .....	16
Resultados .....	20
Conclusiones y recomendaciones.....	31
Referencias .....	32

## Lista de tablas

Tabla 1. Animales del Hogar de Alicia positivos con su respectivo valor en densidad óptica (OD) a 650.....	21
Tabla 2. Animales albergue municipal positivos con su respectivo valor en densidad óptica (OD) a 650.....	21
Tabla 3. Animales positivos de acuerdo al sexo .....	22
Tabla 4. Animales positivos de acuerdo al sexo .....	23
Tabla 5. Animales positivos a Inmunofluorescencia, con su respectiva titulación.....	24
Tabla 6. Animales positivos a inmunofluorescencia, con su respectiva titulación .....	25
Tabla 7. Animales positivos de acuerdo al sexo .....	26
Tabla 8. Animales positivos de acuerdo al sexo .....	26
Tabla 9. <i>Tabla de 2x2</i> en la que se compara los resultados obtenidos por medio de ELISA con IFA.....	27
Tabla 10. Curva Roc, representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad obtenida, en la cual se observa con rojo la curva de referencia y en azul los resultados obtenidos para la prueba ELISA .....	28
Tabla 11. Área bajo la curva (AUC).....	29
Tabla 12. Concordancia entre las mediciones .....	30

## Resumen

*Ehrlichia canis* es una bacteria gram negativa, intracelular obligada, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae* conocida por causar la Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC), la cual es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus Sanguineus*. Este microorganismo afecta principalmente a caninos, generando cuadros clínicos que pueden culminar en la muerte del animal. El diagnóstico de la enfermedad se basa en la historia de contacto del animal con garrapatas, signos clínicos presentes, visualización de mórulas en un extendido de sangre y algunas veces es acompañado de test rápidos disponibles en el mercado. Debido a que en muchas ocasiones no se recurre a pruebas más sofisticadas como PCR o pruebas inmunodiagnósticas confiables, se pretendió evaluar la seroprevalencia de *Ehrlichia* spp en dos albergues caninos en el municipio de Caldas, Antioquia, por medio de dos pruebas Inmunodiagnósticas (ELISA- IFA), un total de 191 muestras de caninos fueron obtenidas, con las cuales se logró determinar una seroprevalencia para ELISA de 11% y para IFA de 12.56% de infección por *E. canis*.

**Palabras clave:** *E.canis*, ELISA, inmunofluorescencia, prevalencia, sensibilidad, especificidad.

## Introducción

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad transmitida por garrapatas (Harrus & Waner, 2011), cuyo principal agente causal es la *Ehrlichia canis* (*E.canis*), bacteria gram negativa, intracelular obligada, pleomórfica, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, la cual presenta distribución mundial y es conocida por generar infecciones graves y mortales en el perro (Zweygarth et al., 2014). La garrapata parda del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) ha sido considerada como su principal vector (Jessica et al., 2012). No se conoce asociación entre sexo, raza o edad con la presentación de la infección, razón por la cual todos los animales son susceptibles (Sainz et al., 2000). El agente tiene tropismo por monocitos y macrófagos, por lo tanto, la enfermedad se conoce como Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) (Maeda, Norman, Robert, Miodrag & Mcdade, 1987). La EMC presenta una manifestación aguda, subaguda y crónica, los signos clínicos en todas las etapas de una infección por *E. canis* pueden ser variables, dependiendo de la cepa, la respuesta inmune del animal afectado y la presencia de infecciones con otros patógenos transmitidos por garrapatas (Sainz & Estrada-Peña, 2015).

*E.canis* ha sido descrita, además, en humanos y se comporta como uno de los agentes causales de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME), la cual ha sido diagnosticada en diferentes países mediante diversas técnicas (Pérez, Bodor, Zhang, Xiong & Rikihisa, 2006; Bouza-Mora et al., 2017 ).

En los animales, el diagnóstico es realizado mediante los signos clínicos, anomalías encontradas en el perfil hemático, visualización de mórulas mediante microscopía en el extendido de sangre periférica, historial de contacto con garrapatas

(Rojas et al., 2013) y algunas veces es complementado con pruebas séricas rápidas (SNAPS) comerciales (Castro, 2015). En algunas ocasiones se han usado metodologías más sensibles como la técnica inmunodiagnóstica *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) y detección de anticuerpos séricos contra *E.canis* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Trevor Waner, Strenger & Keysary, 2000), y en otros casos se utiliza la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permite identificar fragmentos de genes específicos después de la amplificación y posteriormente se realiza la secuenciación de los fragmentos de genes amplificados por PCR en donde se puede dar la identificación de las especies específicas de *E.canis* (Sainz & Estrada-Peña, 2015).

En Colombia el diagnóstico todavía es presuntivo ya que el perfil hemático no brinda seguridad al clínico al momento de diagnosticar y tratar a un paciente, por ello se requiere el uso de pruebas diagnósticas más sofisticadas y confiables (Rojas et al., 2013).

El presente estudio tiene como objetivo establecer la seroprevalencia de *E. canis* en 2 albergues caninos del municipio de Caldas Antioquia mediante las técnicas inmunodiagnósticas ELISA e inmunofluorescencia indirecta y establecer la concordancia de las dos pruebas.

## Justificación

La EMC es una enfermedad que se presenta en perros, causada por la bacteria gram negativa *E.canis*, la cual también puede afectar a los humanos (Bouza-Mora et al., 2017). El principal vector de *E.canis* es la garrapata parda del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Jessica et al., 2012). El diagnóstico de la enfermedad causada por *E. canis* puede ser un reto debido a la variedad de fases y múltiples manifestaciones clínicas en caninos. Realizar un buen análisis de la anámnesis, estudiar la presencia de los signos clínicos típicos y relacionarlos con anomalías hematológicas y bioquímicas pueden ser útiles en el diagnóstico de la EMC (Harrus & Waner, 2011).

En Colombia, el diagnóstico de la enfermedad es muy básico ya que parte del examen físico del animal, la historia de contacto con garrapatas y la observación de mórulas en el extendido de sangre periférica (Rojas et al., 2013), y en algunas ocasiones el diagnóstico es complementado con kits comerciales disponibles en nuestro medio, sin embargo estos kits comerciales no deberían ser la única herramienta diagnóstica debido a que esta puede generar falsos negativos (Posada, 2016). Pocas veces se recurren a métodos más sensibles y específicos que comprenden las técnicas moleculares e inmunodiagnósticas.

El presente estudio pretende comparar dos técnicas inmunodiagnósticas, ELISA indirecta e inmunofluorescencia indirecta para determinar la concordancia en el diagnóstico de la Ehrlichiosis Monocítica Canina de cepas de *Ehrlichia canis* circulantes en ejemplares caninos del municipio de Caldas, Antioquia.

## Marco teórico

La ehrlichiosis canina fue descrita por primera vez en 1935 en Argelia, hoy en día presenta una distribución mundial, particularmente en regiones tropicales y subtropicales (Gutiérrez et al., 2008). En Sur América su presencia ha sido descrita en varios países por diversos autores (más países) (Aguiar, Zhang, Braga, Taques & McBride, 2016; López, Abarca, Mundaca & Caballero, 2011; López et al., 2011 ). *E.canis* es una bacteria gram negativa, intracitoplasmática obligada, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, es el agente etiológico de la EMC. *E. canis* puede causar infecciones graves y mortales en el perro (Zweygarth et al., 2014) y algunos cánidos silvestres (Davidson, Appel, Doster, Baker & Brown, 1992). No existe asociación descrita entre sexo y edad con la presentación de la infección por *E.canis* (Sainz et al., 2000). La garrapata parda del perro *Rhipicephalus sanguineus* ha sido considerada como el principal vector de *E. canis* (Jessica et al., 2012) y se ha demostrado experimentalmente que *Dermacentor variabilis* también tiene la capacidad de transmitir la bacteria (Harrus, Waner, Bark & Jongejan, 1999).

El agente tiene tropismo por monocitos y macrófagos, por lo tanto la enfermedad se conoce como EMC (Maeda et al., 1987), sin embargo esta bacteria se localiza también en las células reticuloendoteliales del hígado, el bazo y los nódulos linfáticos, pero su replicación se lleva a cabo principalmente en los macrófagos (Waner et al., 2000). La Ehrlichiosis Monocítica Canina presenta una manifestación aguda, subaguda y crónica (Labruna & Machado, 2006), los signos clínicos presentados durante la forma aguda son linfadenomegalia, esplenomegalia, coagulopatías y manifestaciones



neurológicas como convulsiones (Souza et al., 2010), mientras que la forma crónica se caracteriza por un cuadro más grave con los mismos signos de la forma aguda (Das & Konar, 2013). Las anomalías hematológicas también son un hallazgo frecuente e incluyen trombocitopenia, anemia leve y leucopenia leve durante la fase aguda, trombocitopenia leve en el estadio subclínico y pancitopenia en la etapa crónica severa, las principales anomalías bioquímicas son la hipoalbuminemia, la hiperglobulinemia y la hipergamaglobulinemia (Harrus et al., 1999).

*E.canis* ha sido identificada además como agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME), reportada en primera instancia en Venezuela, donde 6 de 20 personas resultaron positivas a la amplificación de un segmento del gen 16S rRNA específico para la familia *Anaplasmataceae*, por medio de PCR. Los signos clínicos de la EMC causada por *E.canis* son muy similares a los de HME, estos varían desde una infección asintomática a una enfermedad grave que requiere hospitalización o, incluso, que puede conllevar a la muerte.

La HME severa se caracteriza por fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, anorexia, náuseas o vómitos y pérdida de peso. A menudo es acompañada de hallazgos hematológicos como trombocitopenia y leucopenia, además de anomalías en las enzimas hepáticas. La aparición de meningitis, encefalitis o encefalopatía como resultado de la infección también han sido descritos anteriormente (Pérez et al., 2006). De igual manera *E.canis* ha sido reportada en muestras de donantes en bancos de sangre en Costa Rica utilizando técnicas moleculares y serológicas. La presencia del agente se determinó en 10 (3,6%) de 280 muestras provenientes de donadores de un banco de sangre utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida al

gen conservado ehrlichial dsb. El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) detectó anticuerpos en 35 (35%) de 100 muestras de suero evaluadas. Treinta muestras mostraron títulos de punto final bajo (64-256) contra *E.canis*, mientras que cinco sueros dieron títulos de punto final alto (1024-8192), estas cinco muestras fueron positivas además para *E.canis* por medio de PCR (Bouza-Mora et al., 2017).

La enfermedad en los animales se diagnostica mediante los signos clínicos, anomalías encontradas en el perfil hemático, visualización de mórulas mediante microscopía en el extendido de sangre periférica, historial de contacto con garrapatas (Rojas et al., 2013) y algunas veces es complementado con pruebas séricas rápidas (SNAPS) comerciales (Castro, 2015), sin embargo estos kits comerciales no deben ser la única herramienta diagnóstica debido a que esta puede generar falsos negativos (Posada, 2016). En algunas ocasiones se utilizan métodos más sofisticados como técnicas inmunodiagnósticas, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) y detección de anticuerpos séricos contra *E.canis* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Waner et al., 2000) y en otros casos se utiliza la PCR que permite identificar fragmentos de genes específicos después de la amplificación y posteriormente se realiza la secuenciación de los fragmentos de genes amplificados por PCR en donde se puede dar la identificación de las variantes específicas de *E.canis* (Sainz & Estrada-peña, 2015).

Los signos clínicos pueden ser variables en todas las etapas de la enfermedad natural y pueden ser inexistentes durante la fase subclínica. La prueba IFI se considera el método más confiable y sensible para la detección de anticuerpos en todas las

etapas de la enfermedad (Waner et al., 2000), siendo considerada el *gold standar* para el diagnóstico de la ehrlichiosis (Waner et al., 2001).

En Colombia, la Ehrlichiosis Monocítica Canina se ha diagnosticado en diferentes lugares mediante el uso de diversas técnicas. En la ciudad de Villavicencio se evaluó un grupo de perros aplicando la técnica ELISA y se encontró un alta seroprevalencia (92.9%) de *Ehrlichia* spp (Parrado et al.,2003). En Cali un análisis de muestras fue realizado mediante el uso de un test comercial de ELISA *ImmunoComb* (Biogal Galed Labs) con el fin de detectar anticuerpos específicos contra *Ehrlichia canis*, en este se encontró que los caninos de raza labrador, poodle y schnawzer fueron las razas con mayor presencia de anticuerpos contra la enfermedad (Silva-Molano, Sánchez-Ucrós & Loaiza-Echeverri, 2008). En Santander, un estudio llevado a cabo con el fin de correlacionar los hallazgos en hemograma con un frotis sanguíneo para determinar su relación con la presencia de *E.canis* estableció que no había diferencias significativas entre los parámetros evaluados (González, Rojas, Medellín & Corredor, 2013). En Ibagué se llevó a cabo un estudio de prevalencia mediante IFI y se correlacionaron los resultados con hallazgos clínicos y hematológicos, y el resultado fue que presencia de esplenomegalia fue el hallazgo más común, correspondiente a 4,8% de los animales positivos (Salazar, Buriticá, Echeverry & Barbosa, 2014). De igual manera se diagnosticó *Ehrlichia canis* en la ciudad de Bogotá en 97 muestras de sangre en donde se realizaron las pruebas de Test SNAP 4 DX(R) plus e ImmunoComb(R) Canine Ehrlichia Kit, donde 24 muestras resultaron positivas para *E. canis*, equivalente al 24.7% de seropositividad (Guerrero-Puentes, 2016). En Medellín se han realizado varios estudios, Uno de ellos correspondió a un estudio transversal en

el que se muestreó un grupo de 781 perros de los cuales 24.8% resultaron positivos mediante las técnicas Elisa SNAP de IDEXX© y Rapid *Ehrlichia canis* Ab Inmunocromatográfica de Bionote© (Cartagena Yarce, Ríos Osorio & Cardona Arias, 2015).

En el segundo se detectó *E.canis* mediante técnicas moleculares e inmunodiagnósticas en un albergue en el municipio de Caldas donde concluyeron que la seroprevalencia no concuerda con los resultados obtenidos en la detección molecular *E. canis*, debido a que solamente uno de los 13 ejemplares con detección molecular presentaba anticuerpos contra la bacteria (Posada, 2016) y por último en un estudio realizado en Medellín obtuvieron muestras de 33 animales con signos sospechosos, de los cuales 11 resultaron positivos a la amplificación de un segmento de DNA de 500 pb, correspondiente a una frecuencia del 33.3%, fue concluido que había circulación del agente en el ambiente.

Para el diagnóstico de la Ehrlichiosis Monocítica Canina en el país se encuentran disponibles algunos kits comerciales, como el Kit diagnóstico ANIGEN Rapid *E.canis* ab del laboratorio BIONOTE, el cual es aprobado por el Instituto Colombiano Agropecuario Resolución no. 004470 de 2010. Este se basa en el diagnóstico mediante inmunocromatografía para la detección cualitativa de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en sangre, suero o plasma de perros domésticos(Res-4470-2010-Kit-diagnostico-Anigen.pdf, n.d.).

Otros kits disponibles son el SNAP®4DXKIT DE DIAGNÓSTICO *invitro* para la detección del antígeno de la *Dirofilaria immitis*, anticuerpos frente a *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* y *Ehrlichia canis* en suero, plasma o sangre total

canina. Y el SNAP®3Dx (Antígeno de la *Dirofilaria immitis*, anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* y *Ehrlichia canis*) ambos del laboratorio IDEXX (Castro, 2015).

Sin embargo, en el país el diagnóstico clínico presuntivo todavía se basa en el examen físico del animal, la historia de contacto con garrapatas y observación de mórulas de *Ehrlichia canis* en el extendido de sangre periférica. El perfil hemático no brinda seguridad al clínico al momento de diagnosticar y tratar un paciente, por ello se requiere la utilización de pruebas diagnósticas más sofisticadas y confiables (Rojas et al., 2013) Como lo son las técnicas inmunodiagnósticas ELISA e inmunofluorescencia indirecta.

### **Uso de péptidos para el diagnóstico de ehrlichia canis**

Las secuencias del rRNA gene 16S son 99,9-100% idénticas entre los aislados de *E.canis* de América del Sur (cepas VHE y VDE), Norteamérica (cepa Oklahoma), Asia (genotipo chino AF162860 y genotipo japonés Kagoshima) y Oriente Medio (Turquía e Israel) (Yu, McBride & Walker, 2007). También se ha reportado que las proteínas inmunorreactivas que incluyen la familia OMP-1, la tiodisulfuro oxidorreductasa (Dsb) y las proteínas repetidoras (TRP) 19 y 140 se conservan en cepas geográficamente dispersas (Aguiar et al., 2016). La TRP19 y TRP36 de *Ehrlichia canis* son las principales proteínas inmunorreactivas y tienen como objetivo primario la respuesta de anticuerpos del huésped durante la infección. Las sensibilidades y especificidades de estas proteínas para el inmunodiagnóstico específico de la especie se han determinado utilizando proteínas recombinantes y ensayos basados en péptidos

sintéticos (McBride et al., 2007; Aguiar et al., 2016). El TRP19 está altamente conservado entre las cepas de *Ehrlichia canis* conocidas (McBride et al., 2007; Zhang et al., 2008), sin embargo, se han reportado diferencias en el gen TRP36, lo que indica un grado de diversidad de *Ehrlichia canis* (Zweygarth et al., 2014). La inmunofluorescencia indirecta, es utilizada para detectar anticuerpos, su reacción finaliza mediante la adición de un anticuerpo conjugado a una sustancia fluorescente, habitualmente fluoresceína.

Estas pruebas son muy sensibles pero su interpretación tiene un grado de subjetividad (Pineda, 2012). Respecto a la técnica de ELISA se lleva a cabo inmovilizando un antígeno o anticuerpo sobre una superficie sólida, esta inmovilización permite varias etapas de lavado que son necesarias para separar el reactivo marcado reaccionado del reactivo no reaccionado, después de haber incubado el antígeno con el anticuerpo y habiendo llevado a cabo las etapas de lavado adecuadas para eliminar el exceso de reactivos. Luego la actividad enzimática que queda en la fracción unida se cuantifica mediante la adición de un sustrato no cromático, que se convierte mediante la enzima enlazada, a un producto altamente cromático. La cantidad de color producida es una medida de la cantidad de enzima presente, que a su vez es una medida de la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo presente (Walker & Gaastra, 1987).

## Objetivos

### Objetivo general

Comparar por medio de técnicas inmunodiagnósticas la detección de anticuerpos (IgG) contra *Ehrlichia* spp en dos albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia.

### Objetivos específicos

- Establecer la seroprevalencia de *Ehrlichia* spp. por medio de ELISA indirecta en albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia.
- Establecer la seroprevalencia de *Ehrlichia* spp. por medio de inmunofluorescencia indirecta en albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia.
- Establecer la concordancia entre las técnicas inmunodiagnósticas ELISA e inmunofluorescencia indirecta en ejemplares caninos de dos albergues del municipio de Caldas, Antioquia.

## **Metodología**

### **Diseño y población**

Se realizó un estudio de prevalencia de tipo descriptivo mediante un muestreo de corte transversal entre los meses de septiembre y octubre de 2017 y con firma y consentimiento informado fueron seleccionados ejemplares caninos provenientes de los albergues El hogar de Alicia ubicado en la vereda La Miel, (6.096610,-75.613.618), y el Albergue Municipal de Caldas ubicado en la vereda 60, ambos en el municipio de Caldas, Antioquia.

### **Toma de muestras**

Se tomaron muestras de caninos seleccionados al azar, los cuales se encuentran ubicados en albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia. Las muestras fueron tomadas por medio de venopunción en la vena cefálica o safena con ayuda de jeringas estériles de 3 ml unidas a agujas de calibre 21, fueron depositadas en tubos sin anticoagulante con un volumen aproximado de 3 ml las cuales posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario Hno. Marco Antonio Serna f.s.c. de la Corporación Universitaria Lasallista, donde inicialmente se procedió a separar el suero del coágulo por medio de centrifuga utilizando 3500 rpm x 10 minutos. Los sueros fueron almacenados a -80 °C hasta el momento en que se analizaron para la detección de anticuerpos IgG



## Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Luego de obtener los sueros, estos fueron sometidos a la técnica ELISA indirecta utilizando protocolo para péptidos y proteínas recombinantes (McBride lab). Para llevar a cabo el protocolo se utilizaron platos de ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96-Well Plates Clear Pinchbar MaxiSorp™ Flat-Bottom), los cuales fueron sensibilizados con el péptido Ec TRP19 (24-mer, HFTGPTF-SEVNLSEEEKMELQEVS) el cual se encuentra altamente conservado entre las cepas de *Ehrlichia canis* conocidas (McBride et al., 2007; Zhang et al., 2008). A cada pozo se le agregaron 50µl del péptido diluido en PBS (phosphate buffered saline) y se dejó incubando a 4°C en oscuridad durante una noche; se empleó TBST (tris-buffered saline (TBS) y tween 20 (0.2%)) para preparar el buffer de lavado. El primer lavado se realizó tres veces adicionando a cada pozo 200µl, que posteriormente fueron descartados, luego se preparó una solución de bloqueo la cual se manejó con suero equino marca Sigma H1270 al 10% en TBST, a continuación se realizó el segundo lavado adicionando a cada pozo 200µl nuevamente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con shaker para luego agregar 50 µl del anticuerpo primario, el cual se utilizó en una dilución 1:100, diluido en TBST con 5% de suero equino y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con shaker, después se procedió a realizar un tercer lavado cuatro veces agregando 200 µl de TBST nuevamente a cada pozo; al término de este procedimiento se adicionaron 50 µl del anticuerpo secundario Labeled Affinity purified Antibody to Dog IgG (H+L) [Goat] diluido TBST con 5% de suero equino.

Para finalizar se llevó a incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con shaker, seguido de un cuarto lavado donde se lavó cuatro veces agregando 200µl de TBST a cada pozo. Finalmente se adicionaron 100 µl de sustrato (BluePhos®) con una relación 1:1 entre sus componentes y se procedió a incubar durante 30 minutos con shaker en la oscuridad, para luego terminar realizando lectura a una densidad óptica 65°. Las muestras positivas se consideraron  $\geq 0,3$  (Aguiar et al., 2016; McBride et al., 2007). El equipo utilizado para las incubaciones y la lectura fue el espectofotómetro (Synergy HT Multi-detection reader).

### **Inmunofluorescencia (IFI)**

El suero tomado de las muestras de sangre de los ejemplares caninos fue utilizado para determinar por medio de inmunofluorescencia indirecta, anticuerpos para *Ehrlichia* spp. Se utilizaron placas de 12 pozos, previamente sensibilizadas con células DH82 infectadas de *Ehrlichia canis* y donadas por el doctor Esteban Arroyave.

La respuesta inmune positiva en este test se estableció a partir de títulos iguales o superiores a 1:80 y el conjugado se estableció en 1:100 (Aguirre et al., 2009), el conjugado utilizado fue Anti-Dog IgG (H+L)-Fluorescein antibody produced in goat. Para llevar a cabo el procesamiento de la muestras, se procedió a temperar las placas, las cuales se encontraban a -20°C con PBS durante 10 minutos y se dejó secar por 10 minutos, se comenzó con la dilución de los sueros 1:80 y se adicionó 10µl a cada pozo y se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguido de 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS y shaker continuo, luego de los lavados se puso a secar durante 10 minutos,

al finalizar este, se realizó la dilución del conjugado 1:100 y se adicionaron 10µl a cada pozo, procediendo a incubar a 37°C durante 30 minutos, como último se realizó de 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS y shaker continuo seguido de un secado durante 10 minutos. Cuando la placa se encontraba totalmente seca se procedía a cubrir la placa con el cubreobjetos y se realizaba la lectura de las muestras en el microscopio de fluorescencia.

### **Concordancia entre las técnicas inmunodiagnósticas ELISA e inmunofluorescencia indirecta**

Se buscó establecer estadísticamente cuán acordes se encontraban entre sí los resultados obtenidos por medio de ambas técnicas. Los resultados obtenidos se registraron en una base de datos de Excel (Microsoft office, 2013). La sensibilidad y especificidad relativa de las pruebas se calculó por medio de la tabla de contingencia de dos filas por dos columnas; de tal manera se realizó la comparación ELISA indirecta e inmunofluorescencia indirecta (Prueba Gold Estándar); además se utilizó la prueba de índice de Kappa (Cortés-Reyes, Rubio-Romero & Gaitán-Duarte, 2010) y tablas de 2X2 para evaluar el nivel de concordancia entre las pruebas y obtener así los valores de sensibilidad (Se), especificidad (Sp), Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN) y significancia estadística de la prueba. Se llevó a cabo además el desarrollo de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic o Curva de Rendimiento Diagnóstica) con su respectivo análisis del área bajo la curva con el fin de representar la sensibilidad frente a la especificidad gráficamente. Todos los análisis estadísticos se analizaron con el programa IBM SPSS Statistics 23®.

## Resultados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos planteados inicialmente.

El primer objetivo propuesto fue **establecer la seroprevalencia de *Ehrlichia* spp. por medio de ELISA indirecta en albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia.**

Siguiendo el protocolo para ELISA previamente descrito se realizó el corrido de la totalidad de las muestras tomadas, obteniendo los siguientes resultados:

Un total de 125 caninos fueron muestreados en el Hogar de Alicia, de los cuales 63,2% (79) fueron reportados como hembras y 36.8% (46) como machos. En total 13 animales se consideraron positivos ya que presentaron anticuerpos específicos contra el péptido TRP19 con un valor de densidad óptica  $\geq 0.3$  OD (Aguiar et al., 2016). Véase la tabla 1 en la página siguiente que muestra estos resultados.

En el albergue municipal del municipio de Caldas se realizó una toma de muestras en la cual se incluyó a 66 caninos, de los cuales 39,4% (26) fueron machos y 60,6% (40) hembras, de estos, 8 individuos resultaron positivos, mostrando anticuerpos contra el péptido TRP19. La tabla 2, en la página siguiente, permite visualizar los resultados ya mencionados.

**Tabla 1.** Animales del Hogar de Alicia positivos con su respectivo valor en densidad óptica (OD) a 650

Identificación del animal	Valor 650 OD
18	1,98
19	0,645
28	0,83
30	0,939
33	0,301
48	1,783
51	0,625
60	2,662
65	1,146
73	1,477
81	0,3
124	2,253
136	1,733

**Tabla 2.** Animales albergue municipal positivos con su respectivo valor en densidad óptica (OD) a 650

Identificación del animal	Valor 650 OD
163	0,469
173	1,854
176	1,546
181	1,41
201	0,993
203	1,35
207	1,002
209	1,372

Para establecer la seroprevalencia de *E.canis* en los albergues se hizo uso de la fórmula plasmada a continuación:

$$\frac{\text{Animales positivos}}{\text{Poblacion total}} \times 100 = \frac{21}{191} = 10,9947644$$

De la totalidad de animales muestreados en ambos albergues se infiere que aproximadamente el 11% del total de la población, correspondiente al 10,4% de la población del Hogar de Alicia y 12,1% del albergue municipal presentaron anticuerpos específicos que reaccionaron contra antígenos de *E. canis*.

Se realizó un cálculo para establecer el porcentaje de infección de acuerdo al sexo en cada uno de los albergues, lo cual arrojó que en el Hogar de Alicia, el 12,2% de la población de machos, correspondiente al 4,8% de la población total de caninos del albergue resultaron positivos a la presencia de anticuerpos contra *E. canis*, al igual que el 9,2% de las hembras muestreadas, correspondientes al 5,6% de la población total del albergue (tabla 3).

**Tabla 3.** Animales positivos de acuerdo al sexo

Hogar de Alicia			
<i>ELISA</i>	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>Total</i>
<i>Machos</i>	6	43	49
<i>Hembras</i>	7	69	76

En el albergue municipal del municipio de Caldas, se demostró que el 7,7% de los machos resultaron positivos, correspondiente al 3% de la población total, mientras que en hembras el porcentaje de infección reveló un 15%, correspondiente a un 9% de la totalidad de animales muestreados en este sitio (tabla 4).

**Tabla 4.** Animales positivos de acuerdo al sexo

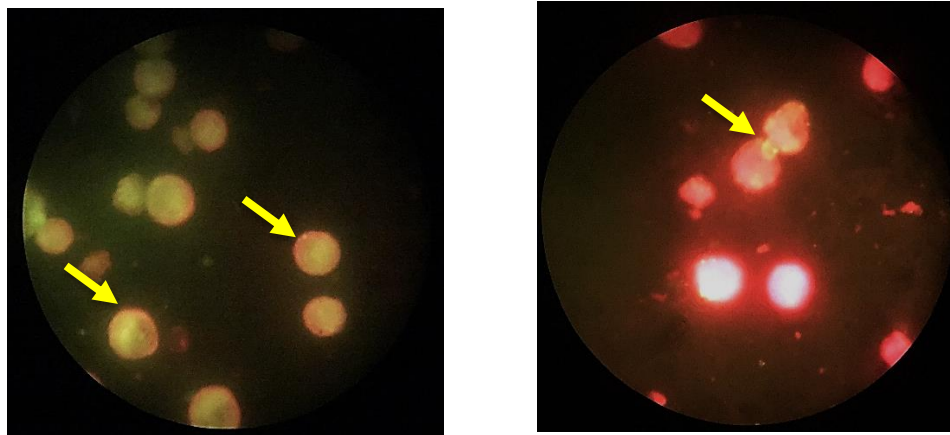
Albergue Municipal			
<i>ELISA</i>	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>Total</i>
<i>Machos</i>	2	24	26
<i>Hembras</i>	6	34	40

El segundo objetivo fue **establecer la seroprevalencia de Ehrlichia spp. por medio de inmunofluorescencia indirecta en albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia.**

Con el protocolo descrito previamente se procesó la totalidad de las muestras obtenidas, mostrando como resultado los datos expuestos a continuación:

En el Hogar de Alicia se tomó un total de 125 muestras correspondientes a los mismos animales previamente descritos. Fueron considerados positivos aquellos animales que al momento del análisis presentaron fluorescencia. De dicha población, 15 muestras fueron positivas, presentando fluorescencia marcada (véase la imagen en la página siguiente), a su vez estas fueron tituladas realizando diluciones de las mismas.

Imagen. Fotos de muestras positivas a Inmunofluorescencia, señalado con la flecha



**Tabla 5.** Animales positivos a Inmunofluorescencia, con su respectiva titulación

Identificación del animal	Títulos IFA
18	2560
19	2560
28	1280
30	5120
33	640
48	1280
51	5120
53	640
60	2560
62	80
65	1280
73	2560
81	640
124	320



136

1280

Para el albergue municipal de Caldas, se trabajó igualmente con las muestras previamente descritas, de las cuales 9 de 66 resultaron positivas, estas fueron seleccionadas y posteriormente se realizó titulación de las mismas de igual manera.

**Tabla 6.** Animales positivos a inmunofluorescencia, con su respectiva titulación

Identificación del animal	Títulos IFA
163	640
173	1280
176	1280
181	1280
184	160
201	2560
203	2560
207	2560
209	320

Para establecer el porcentaje de seroprevalencia de la prueba se aplicó la misma ecuación previamente planteada para la técnica ELISA.

$$\frac{\text{Animales positivos}}{\text{Poblacion total}} \times 100 \quad \frac{24}{191} = 12,56544503$$

Aplicando la ecuación se logró determinar una seroprevalencia del 12.56% de infección por *E. canis* en la totalidad de la población.

Tal como en la prueba anterior, se calculó el porcentaje de animales positivos para cada albergue sobre el total de la población, lo cual arrojó el siguiente resultado: de 49 machos presentes en el Hogar de Alicia 7 presentaron anticuerpos que hizo que se consideraran como positivos, al igual que 8 de 76 hembras allí presentes, lo cual corresponde a un 14,3% del total de los machos del albergue o 5,3% de la totalidad de la población allí albergada, así mismo, presentaron títulos de anticuerpos el 10,52% de la totalidad de hembras o 6,4% de la población muestreada (tabla 7).

**Tabla 7.** Animales positivos de acuerdo al sexo

Hogar de Alicia			
<i>IFA</i>	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>Total</i>
<i>Machos</i>	7	42	49
<i>Hembras</i>	8	68	76

7,69% de la totalidad de machos muestreados resultaron positivos en el albergue municipal del municipio de Caldas, correspondiente al 3% de la totalidad de la población del albergue. Así mismo 17,5% de las hembras presentaron títulos considerables de anticuerpos, lo que corresponde a 10,6% del total de la población allí presente (Tabla 8).

**Tabla 8.** Animales positivos de acuerdo al sexo

Albergue Municipal			
<i>IFA</i>	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>Total</i>
<i>Machos</i>	2	24	26
<i>Hembras</i>	7	33	40

El tercer objetivo planteado fue **establecer la concordancia entre las técnicas inmunodiagnósticas ELISA e Inmunofluorescencia indirecta en ejemplares caninos de dos albergues del municipio de Caldas, Antioquia**. Para hallar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo se realizó una tabla de 2x2.

**Tabla 9.** *Tabla de 2x2 en la que se compara los resultados obtenidos por medio de ELISA con IFA*

		IFA	
		<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>
<i>ELISA</i>	<i>Positivos</i>	21	0
	<i>Negativos</i>	3	167

Los datos obtenidos a partir de la tabla anterior se expresan con los siguientes valores:

- Verdaderos Positivos (VP): 21
- Falsos Negativos (FN): 3
- Falsos Positivos (FP): 0
- Verdaderos Negativos (VN): 167

De acuerdo a los valores encontrados se procedió a hallar la sensibilidad (Se) de la prueba la cual arrojó un 87% de la misma, lo que indica que los caninos que presentaron anticuerpos para IFI fueron diagnosticados simultáneamente mediante

ELISA en un 87%. El porcentaje de especificidad (Es) de la prueba fue de un 100%, las muestras que fueron consideradas negativas para ELISA fueron consideradas VN respecto a IFI. Para VPP y VPN los resultados obtenidos fueron 100% y 98% respectivamente, lo que indica que la probabilidad de exista la presencia de la infección si la prueba es positiva es de 100%, mientras que la probabilidad de que el individuo no presente la infección si le prueba resulta negativa es de 98%. A continuación se muestra las ecuaciones utilizadas para hallar los valores afirmados:

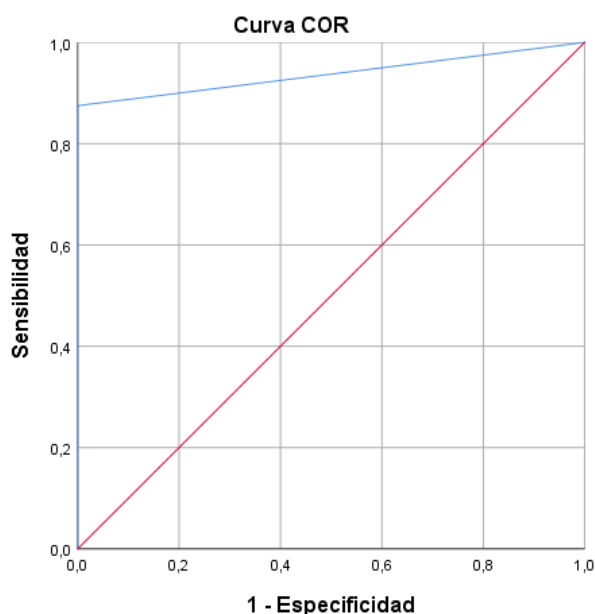
$$(Se) = VP / (VP + FN) \quad 21 / (21 + 3) * 100 = 87\%$$

$$(Es) = VN / (VN + FP) \quad 167 / (167 + 0) * 100 = 100\%$$

$$(VPP) = VP / (VP + FP) \quad 21 / (21 + 0) * 100 = 100\%$$

$$(VPN) = VN / (VN + FN) \quad 167 / (167 + 3) * 100 = 98\%$$

**Tabla 10.** Curva Roc, representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad obtenida, en la cual se observa con rojo la curva de referencia y en azul los resultados obtenidos para la prueba ELISA



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

**Tabla 11.** Área bajo la curva (AUC)**Área bajo la curva**

Variables de resultado de prueba: ELISA

Área	Desv. Error <sup>a</sup>	Significa- ción asintó- tica <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza asintótico	
			Límite inferior	Límite superior
,938	,040	,000	,859	1,000

Las variables de resultado de prueba: ELISA tienen, como mínimo, un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Las estadísticas podrían estar sesgadas.

a. Bajo el supuesto no paramétrico  
b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Con los resultados obtenidos se podría inferir que la prueba ELISA alcanza un alto grado de sensibilidad y especificidad cuando se compara con la prueba IFI, lo cual se aprecia en la curva obtenida, que alcanza un punto cercano al del corte (tabla 10), lo que puede ser confirmado con el área bajo la curva que arroja un valor del 93% (tabla 11) permitiendo inferir que la prueba ELISA puede ser considerada como muy buena según los intervalos para los valores de AUC.

Para medir el grado de acuerdo entre ambas mediciones se recurrió al índice Kappa, el cual arrojó un 92,4%, que de acuerdo a la interpretación del índice kappa se infiere que estas pruebas presentan muy buena concordancia.

**Tabla 12.** Concordancia entre las mediciones

		<b>Medidas simétricas</b>			
		Valor	Error estándar asintótico <sup>a</sup>	T aproximada <sup>b</sup>	Significación n aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,924	,043	12,813	,000
N de casos válidos		191			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

## Conclusiones y recomendaciones

La comparación entre la ELISA e inmunofluorescencia demostró que en los albergues la mayoría de las muestras concordaron con el resultado de ambas, exceptuando 3 muestras que fueron positivas a IFA pero negativas a ELISA, lo que se puede explicar en que el péptido TRP19 usado en la ELISA está sintetizado a partir de un fragmento de nucleótidos altamente conservado entre las cepas de *Ehrlichia canis* conocidas, a diferencia de la IFA que puede presentar reacciones cruzadas entre diferente especies de Ehrlichia y Anaplasma, por lo que se podría plantear que estas muestras presentan anticuerpos contra otras especies de microorganismos de la familia *anaplasmataceae*.

Debido a que puede existir la presencia de reacciones serológicas cruzadas entre diferentes especies de Ehrlichia y Anaplasma, la serología debería ser complementada con técnicas moleculares, como PCR y secuenciación de ADN que permitan obtener resultados concretos para determinar la especie de microorganismo presente.

Se recomendaría hacer uso de algunos de los SNAPS disponibles en nuestro medio, para comparar las muestras que fueron positivas a la prueba IFI, con el fin de realizar pruebas sensibilidad y especificidad.

Debido a la alta sensibilidad, especificidad y a la concordancia entre ambas pruebas, sumado a la alta capacidad de procesamiento de muestras en menor tiempo mediante el protocolo de ELISA planteado y su interpretación cuantitativa, se sugiere

que este método puede ser tan bueno o incluso superior a la prueba considerada como gold estándar para el diagnóstico de *E.canis*.

### Referencias

- Aguiar, D. M., Zhang, X., Braga, I. A., Taques, I. & Mc Bride, J. W. (2016). Detection of genotype-specific Ehrlichia canis exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7 (1), 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.003>
- Aguirre, E., Ayllón, T., Sainz, Á., 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. *The Veterinary Journal*, 182 (2), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.07.013>
- Bouza-Mora, L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zúñiga, J. J., Salazar-Sanchez, L., Labruna, M. B., & Aguiar, D. M. (2017). Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8 (1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.012>
- Cardiel, G. (2012). Métodos de diagnóstico de Ehrlichia canis. (Tesis pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón (México)
- Cartagena Yarce, L. M., Ríos Osorio, L. A. & Cardona Arias, J. A. (2015). Seroprevalence of Ehrlichia canis in Dogs with Suspected Infection by Tick-Borne Pathogens in Medellín, 2012-2014. *Revista de Medicina Veterinaria*, (29), 51–62. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-93542015000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542015000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Castro, D. (2015). Comparación de frotis sanguíneo y serología como métodos de diagnóstico en Ehrlichiosis canina. (Tesis de pregrado). Corporación Universitaria Lasallista. Caldas.



- Carrillo, L., Betancur, S., Rondan, D., Pérez, J., Galeano, D., Loaiza, E. y Giraldo, C. (2012). Implementation of a PCR-based method for the diagnosis of Ehrlichia spp , in canine in Medellin. *CES Veterinaria y zootecnia*, 7 (2), 38–46.
- Cortés-Reyes, E., Rubio-Romero, J. A. & Gaitán-Duarte, H. (2010). Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproductibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, 61 (3), 247–255.
- Das, M. & Konar, S. (2013). Clinical and hematological study of canine Ehrlichiosis with other hemoprotozoan parasites in Kolkata, West Bengal, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3 (11), 913–915. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60178-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60178-1)
- Davidson, W. R., Appel, M. J., Doster, G. L., Baker, O. E. & Brown, J. F. (1992). Diseases and Parasites of Red Foxes, Gray Foxes, and Coyotes From Commercial Sources Selling To Fox-Chasing Enclosures. *Journal of Wildlife Diseases*, 28 (4), 581–589. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-28.4.581>
- González, A. M., Rojas, E., Orlando, M., Medellín, P. & Corredor, D. J. G. (2013). Correlación entre hemograma y frotis sanguíneo para determinar E . canis en la vereda Peñitas de Puente Nacional. *Ciencia y agricultura*, 10 (1), 17–23.
- Guerrero-Puentes, C. (2016). Problemática de la Ehrlichiosis canina vista desde el aspecto teórico y el aspecto clínico en una clínica veterinaria de Bogotá (central de urgencias veterinarias). (Tesis de pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Gutiérrez, C. N., Martínez, M., Sánchez, E., De Vera, M., Rojas, M., Ruiz, J. & Triana-Alonso, F. J. (2008). Cultivation and molecular identification of Ehrlichia canis and Ehrlichia chaffeensis from a naturally co-infected dog in Venezuela. *Veterinary Clinical Pathology*, 37 (3), 258–265. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00046.x>

- Harrus, S. & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, 187 (3), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F. & Cornelissen, A. (1999). MINIREVIEW Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 37 (9), 2745–2749.
- Quijada, j., García, M., Betancourt, A., Medina, O., Isis, V. y García, H. (2012). Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de Venezuela. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 13 (8), 1–16. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100231>
- López, J., Abarca, K., Mundaca, M. y Caballero, C. (2011). Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile. *Revista chilena de infectología*, 29 (5), 527–530.
- Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R., Ristic, M. (1987). Human Infection with *Ehrlichia canis*, a Leukocytic Rickettsia. *The New England Journal of Medicine*, 316, 853–856.
- Mc Bride, J. W., Doyle, C. K., Zhang, X., Cardenas, A. M., Popov, V. L., Nethery, K. A. & Woods, M. E. (2007). Identification of a glycosylated *Ehrlichia canis* 19-kilodalton major immunoreactive protein with a species-specific serine-rich glycopeptide epitope. *Infection and Immunity*, 75 (1), 74–82. <https://doi.org/10.1128/IAI.01494-06>
- Pérez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>
- Posada, J. F. (2016). Detección molecular e inmunodiagnóstica de bacterias de la Familia Anaplasmataceae en un albergue canino del Municipio de Caldas. *Revista MVZ de Córdoba*, 22.

- Rojas, A., Rueda, A., Díaz, D., Mesa, N. C., Benavides, J., Imbachi, K y López, R. (2013). Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinaria Y Zootecnia*, 7 (1), 37–48.
- Sainz, A., Roura, X., Miro, G., Kohon, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L. & Estrada-peña, A. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites y Vectors*, 8 (75). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Salazar, H., Buriticá, E. F., Echeverry, D. F. & Barbosa, I. X. (2014). Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 7 (1), 56–63.
- Silva-molano, R. F., Sánchez-ucrós, N. & Loaiza-echeverri, A. M. (2008). Reporte de presentación de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. *Veterinaria Y Zootecnia*, 2 (1), 27–31.
- Souza, B., Leal, D. C., Barboza, D., Uzeda, R. S., De Alcantara, A. C., Ferreira, F. & Labruna, M. B. (2010). Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia*, 19 (2), 89–93. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01902004>
- Walker, J. M. & Gaastra, W. (1987). *Techniques in molecular biology*. Springer: New York.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A. & Cornelissen, A. (2001). Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 95 (1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00407-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00407-6)
- Waner, T., Strenger, C. & Keysary, A. (2000). Comparison of a Clinic-Based ELISA Test Kit with the Immunofluorescence Test for the Assay of *Ehrlichia Canis* Antibodies in Dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (3), 240–244. <https://doi.org/10.1177/104063870001200307>

- Yu, X., Mc Bride, J. W. & Walker, D. H. (2007). Restriction and expansion of Ehrlichia strain diversity. *Veterinary Parasitology*, 143 (3–4), 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.027>
- Zhang, X., Luo, T., Keysary, A., Baneth, G., Miyashiro, S., Strenger, C. & McBride, J. W. (2008). Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed Ehrlichia canis strains. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15 (7), 1080–1088. <https://doi.org/10.1128/CVI.00482-07>
- Zweygarth, E., Cabezas-Cruz, A., Josemans, A. I., Oosthuizen, M. C., Matjila, P. T., Lis, K. & Passos, L. M. F. (2014). In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant Ehrlichia canis isolates. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5 (4), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.011>