

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA E INMUNOFENOTÍPICA
DE LA “EHRlichiosis CANINA”: EVOLUCIÓN TRAS LA
ADMINISTRACIÓN DE “DIPROPIONATO DE
IMIDOCARB”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Lorente Méndez

Bajo la dirección de los doctores

Ángel Sainz Rodríguez

Miguel Ángel Tesouro Díez

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2853-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

***EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA E INMUNOFENOTÍPICA
DE LA EHRLICHIOSIS CANINA. EVOLUCIÓN TRAS LA
ADMINISTRACIÓN DE DIPROPIONATO DE IMIDOCARB.***

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Carmen Lorente Méndez

Dirigida por:

Ángel Sainz Rodríguez

Miguel Ángel Tesouro Díez

Madrid 2005

Este trabajo está dedicado a mis hijos Rafa y Jaime
y a mis padres Carmita y Antonio.
Gracias a mis padres por haberme dado la vida
y a la vida por haberme dado a mis hijos.
Todo alrededor de ellos es vida.

AGRADECIMIENTOS

- A Ángel Sainz y Miguel Ángel Tesouro por haber dirigido este trabajo, por su hacer profesional y por el ímpetu y trabajo aportado. Pero sobretodo por lo fácil que es trabajar con ellos, por su excelencia como personas, por su aliento y ánimo continuo y por poder contar con su amistad.
- A Enrique O'connor por accesibilidad y disposición y porque su ayuda ha sido imprescindible en la realización de este proyecto.
- A Marta Escudero por su colaboración y por el tiempo y dedicación que me ha prestado en el procesamiento de las muestras.
- A Enrique Blas por su ayuda en el inicio de este proyecto.
- A Palmira, por su amor a los animales y su dedicación exclusiva a ellos, por su actividad infatigable y por su buena disposición y alegría en la colaboración prestada.
- A Paco & Paco por su ayuda y compañía en la extracción de sangre de tantos perros.
- A la SVPAP por su colaboración a la investigación y sobretodo a Nuria y a Carmen que me facilitaron el acceso a sus instalaciones.
- A Tino porque siempre coge el teléfono contento y te recibe con una sonrisa.
- A Peter F. Moore que me proporcionó los anticuerpos monoclonales.
- Al conjunto de todos mis compañeros de la Facultad, porque son compañeros y amigos y siempre han estado conmigo en los momentos difíciles. En especial quiero agradecer la ayuda que me han prestado en momentos muy difíciles para mí a María, Marta, Ángel Hernández, Katy, Ana, Joaquín Ortega, Ángel García, Loles, Fernando Liste y Santi; gracias por escucharme, por ayudarme y sobretodo por vuestra amistad.
- A Regino, que me escucha y me quiere. Gracias por recuperar el sol para mí.
- A mis padres por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

- A mis hermanos por su cariño, por sus risas, por sus bromas y por ser ellos.
- A mis primos y tíos, porque somos una gran familia y siempre están ahí dispuestos a ayudar, transmitiendo confianza y felicidad.
- A mi yaya, que es una mujer sabia y siempre me ha dado amor y comprensión.
- A mis hijos porque están llenos de vida, alegría y amor y porque han hecho la tesis conmigo.
- A Dios por haberme dado tanto.

ÍNDICE

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u>	5
<u>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	11
2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>EHRlichia</i>	13
2.2 ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ehrlichia</i> Y GÉNEROS PRÓXIMOS QUE AFECTAN A LOS CÁNIDOS	17
2.3.1. Género <i>Ehrlichia</i>	17
2.3.2. Género <i>Anaplasma</i>	21
2.3.3. Género <i>Neorickettsia</i>	24
2.3 EHRlichiosis HUMANA	26
2.3.1 Etiología y epidemiología	26
2.3.2 Cuadro clínico	30
2.3.3 Concurrencias	31
2.4. EHRlichiosis EN ESPAÑA	33
2.5. TRANSMISIÓN POR GARRAPATAS DE LAS EHRlichiosis HUMANAS Y ANIMALES	36
2.6. INMUNOPATOGENIA	42
2.6.1. Inmunidad innata	43
2.6.2. Inmunidad adquirida	48
2.6.2.1 Inmunidad humoral	49
2.6.2.2 Inmunidad celular	51
2.7 CUADRO CLÍNICO	63
2.8 ALTERACIONES LABORATORIALES EN EL CURSO DE LA EHRlichiosis CANINA	67
2.8.1 Alteraciones hematológicas	67
2.8.2 Alteraciones bioquímicas	70

2.9 DIAGNÓSTICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA	73
2.9.1 Diagnóstico clínico	73
2.9.2 Diagnóstico diferencial	74
2.9.3 Diagnóstico laboratorial	75
2.9.3.1 Pruebas laboratoriales inespecíficas	75
2.9.3.2 Pruebas laboratoriales específicas	76
2.9.3.2.1 Examen microscópico del agente etiológico	76
2.9.3.2.2 Diagnóstico serológico	77
2.9.3.2.3 Diagnóstico molecular	80
2.10 TRATAMIENTO	82
2.10.1 Evolución post-tratamiento	85
2.11 PROFILAXIS	87
2.12 CITOMETRÍA DE FLUJO	90
2.12.1 Detección de antígenos de superficie por inmunofluorescencia	93
2.12.2 Componentes del citómetro de flujo	95
2.12.2.1 Sistema óptico	95
2.12.2.2 Sistema de iluminación	96
2.12.2.3 Sistema hidráulico	96
2.12.2.4 Sistema electrónico	97
2.12.3.5 Sistema de adquisición y análisis de datos	98
2.12.3 Gráficos anexos de citometría de flujo	99
<u>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</u>	103
3.1 PLAN DE TRABAJO	105
3.2 SELECCIÓN DE LOS ANIMALES	106
3.3 TRATAMIENTO	108
3.4 PLANIFICACIÓN DE LOS CONTROLES	108
3.5 RECOLECCIÓN DE LA SANGRE	109

3.6 HEMATOLOGÍA COMPLETA	110
3.7 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA	111
3.8 DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO: INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	111
3.8.1 Antígeno empleado	112
3.8.2 Técnica de inmunofluorescencia indirecta	112
3.9 CITOMETRÍA DE FLUJO	114
3.10 ANTICUERPOS MONOCLONALES (MAB)	118
3.11 POBLACIONES LEUCOCITARIAS E INMUNOFENOTIPO	121
3.12 ESTUDIO ESTADÍSTICO	123
<u>4.- RESULTADOS</u>	125
4.1 SEROPREVALENCIA DE EHRLICHIOSIS EN LOS COLECTIVOS ESTUDIADOS	128
4.2 ESTADÍSTICOS BÁSICOS DEL GRUPO CONTROL	129
4.2.1 Eritrograma e índices eritrocitarios	129
4.2.2 Plaquetas	129
4.2.3 Proteínas séricas	130
4.2.4 Recuento leucocitario e inmunofenotipo	130
4.3 ESTADÍSTICOS BÁSICOS DEL GRUPO CON EHRLICHIOSIS	133
4.3.1 Eritrograma e índices eritrocitarios	133
4.3.2 Plaquetas	134
4.3.3 Proteínas séricas	134
4.3.4 Recuento leucocitario e inmunofenotipo	135
4.4 CORRELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS	138
4.4.1 Correlaciones entre las distintas variables en el grupo control	139
4.4.2 Correlaciones entre las distintas variables en el grupo de perros con ehrlichiosis	147
4.5 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DATOS OBTENIDOS DE POBLACIÓN SANA Y DE POBLACIÓN CANINA INFECTADA CON <i>Ehrlichia canis</i> ANTES DEL TRATAMIENTO	158
4.5.1 Hematología: eritrograma e índices eritrocitarios	158

4.5.2 Plaquetas	161
4.5.3 Proteínas séricas	162
4.5.4 Recuento leucocitario y poblaciones leucocitarias	164
4.5.5 Poblaciones linfocitarias	169
4.5.6 Subpoblaciones linfocitarias	173
4.6 EVOLUCIÓN POST-TERAPÉUTICA DE PARÁMETROS ESTUDIADOS EN PERROS CON EHRLICHIOSIS.	179
4.6.1 Hematología: eritrograma e índices eritrocitarios	179
4.6.2 Plaquetas	186
4.6.3 Proteínas séricas	188
4.6.4 Recuento leucocitario e inmunofenotipo	194
4.6.5 Subpoblaciones linfocitarias referidas a la población de linfocitos T	215
<u>5.- DISCUSIÓN</u>	223
5.1 PREVALENCIA DE EHRLICHIOSIS CANINA EN LAS POBLACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO	225
5.2 POBLACIÓN CONTROL	226
5.2.1 Hematología: eritrograma, índices eritrocitarios y plaquetas	227
5.2.2 Proteínas séricas	227
5.2.3 Recuento leucocitario y recuento diferencial de leucocitos	227
5.2.4. Poblaciones linfocitarias: Inmunofenotipo	228
5.2.4.1 Poblaciones linfocitarias	230
5.2.4.2 Subpoblaciones linfocitarias	233
5.3 POBLACIÓN CON EHRLICHIOSIS	237
5.3.1 Hematología: eritrograma e índices eritrocitarios	238
5.3.2 Plaquetas	239
5.3.3 Proteínas séricas	240
5.3.4 Recuento de leucocitos	241

5.3.5 Recuento diferencial de poblaciones leucocitarias	242
5.3.6 Poblaciones linfocitarias: Inmunofenotipo	246
5.3.6.1 Poblaciones linfocitarias	246
5.3.6.2 Subpoblaciones linfocitarias	249
5.3.6.2 Correlaciones entre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias con otros parámetros hematológicos	255
5.4 EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS EN PERROS CON EHRLICHIOSIS	258
6.- <u>CONCLUSIONES</u>	263
7.- <u>RESUMEN</u>	269
8.- <u>SUMMARY</u>	273
9.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	277

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A/G	Cociente albúmina/globulinas
ANA	Anticuerpos antinucleares
APC	Células presentadoras de antígeno (Antigen presenting cells)
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Desv.	Desviación
EGC	Ehrlichiosis granulocítica canina
EGH	Ehrlichiosis granulocítica humana
EMC	Ehrlichiosis monocítica canina
EMH	Ehrlichiosis monocítica humana
Estánd.	Estándar
Felv	Virus de la leucemia felina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Virus de la inmunodeficiencia felina
FS	Dispersión frontal de luz
GR	Glóbulos rojos
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HB	Hemoglobina
Htc	Hematocrito
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL	Interleuquina
IFN- γ	Interferón-gamma
LGL	Linfocitos granulares grandes
MCP	Monocyte chemotactic protein
Mín	Mínimo

MIP	Macrophage inflammatory protein
NK	Natural killer
PBS	Solución tamponada de fosfato
PE	Ficoeritrina
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
PT	Proteínas totales
SMF	Sistema mononuclear fagocitario
SS	Dispersión lateral de luz
SVPAP	Sociedad valenciana protectora de animales y plantas
Tc	T citotóxicos
Test distr. N	Test de distribución normal
Th	T auxiliares
TCR	Receptor antígeno-específico de los linfocitos T
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
VCM	Volumen corpuscular medio

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Me gustaría comenzar esta memoria que recoge el trabajo que presento para optar al grado de doctora, con un reconocimiento a todas aquellas personas que inician un trabajo de investigación y que, tras un periodo largo de estudio, por razones ajenas e inesperadas, ven interrumpido su trabajo sin posibilidades de proseguir con el mismo tema. Esta situación tan desgraciada me sorprendió hace unos años y, tras un periodo de lamento y dudas, decidí proseguir con el esfuerzo de continuar con mi Tesis Doctoral, trabajo que afortunadamente hoy puedo presentar.

Desde el año 1997 fue creciendo mi interés por el tipo de respuesta inmunitaria generada en el curso de la leishmaniosis canina. El conocimiento de nuevas técnicas como la citometría de flujo y el marcaje con anticuerpos monoclonales de los linfocitos me motivó a realizar un estudio con el propósito de investigar el inmunofenotipo linfocitario en perros con leishmaniosis. Durante tres años fui conservando muestras de sangre de perros con esta enfermedad, obtenidas antes y después de su tratamiento, para su posterior estudio por citometría de flujo.

Cuando en el año 2000 conseguí los anticuerpos monoclonales para este estudio y la colaboración del Servicio de Citometría de Flujo de la Universidad de Valencia,

comprobé que todas las muestras conservadas hasta aquel momento, desgraciadamente, se habían estropeado.

Mientras, la ehrlichiosis canina iba cobrando mayor relevancia en nuestro país y se comprobaba la existencia de una elevada prevalencia en Valencia. Tanto la leishmaniosis como la ehrlichiosis son producidas por patógenos intracelulares, pareciendo similares sus mecanismos inmunitarios. La respuesta inmunitaria en el curso de la ehrlichiosis canina era incluso peor conocida que en el curso de la leishmaniosis. Además, la ehrlichiosis canina había suscitado un creciente interés en el equipo investigador del Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis de la Universidad Complutense de Madrid, donde yo estaba realizando mis estudios de tercer ciclo, por lo que nos decidimos a cambiar el objeto de la investigación a la tipificación del inmunofenotipo de perros con ehrlichiosis. Las especiales características epidemiológicas y nosológicas de esta enfermedad podrían facilitar el trabajo, aliviando en cierta medida el tiempo y esfuerzos previamente perdidos.

Así, a mediados del año 2001 planificamos e iniciamos esta investigación, en la que nos proponíamos profundizar en el estudio de la ehrlichiosis canina, comenzando con un aspecto en aquel momento muy poco conocido, el estudio del inmunofenotipo en los perros con esta enfermedad, para proseguir con este mismo estudio tras la aplicación de un tratamiento específico, analizando los posibles cambios que pudieran producirse en las poblaciones linfocitarias.

En aquellos tiempos estábamos colaborando con algunas protectoras, lo que nos facilitaba poder contar con una amplia población canina, que presumiblemente presentaría una elevada prevalencia de ehrlichiosis. En estos colectivos, dadas sus características, igualmente coexisten en mayor o menor medida otras patologías que, en principio, podrían interferir nuestro estudio. Por ello, decidimos trabajar con perros afectados de ehrlichiosis en fase subclínica, ya que de las distintas fases del curso de la enfermedad es, sin duda, la fase más fácilmente reconocible y homogénea. Además, la ausencia de síntomas en los perros nos permitía descartar otras enfermedades. En cualquier caso, para seleccionar nuestra muestra de animales, decidimos establecer diferentes criterios que nos descartaran la posible existencia de coinfecciones y, de ese modo, tener una mayor seguridad de que los perros seleccionados tan sólo padecían ehrlichiosis.

Para el tratamiento, elegimos el dipropionato de imidocarb debido a los escasos estudios al respecto y al hecho de que el otro fármaco habitualmente empleado, la doxiciclina, parece poseer un cierto efecto inmunomodulador y, por lo tanto, podría influir en las variaciones del inmunofenotipo. Además, con el tratamiento con dipropionato de imidocarb garantizábamos, mejor que con la doxiciclina, la correcta administración del protocolo terapéutico.

Tras estas decisiones previas, nos planteamos como **principales objetivos** del trabajo:

- Caracterizar el inmunofenotipo linfocitario en perros sanos, a través del marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD21, con el fin de obtener unos resultados de referencia.
- Caracterizar el inmunofenotipo linfocitario en perros infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*, en fase subclínica, y compararlos con los resultados obtenidos en perros sanos.
- Caracterizar las alteraciones hematológicas y de proteínas séricas en perros en la fase subclínica de la infección por *Ehrlichia canis*, e investigar sus posibles asociaciones con los resultados del inmunofenotipo linfocitario con el fin de descubrir si alguno de estos parámetros rutinarios pudiera ser indicador de alguna población o subpoblación linfocitaria.
- Valorar las variaciones en parámetros hematológicos, proteínas séricas y del inmunofenotipo linfocitario en perros con ehrlichiosis, en fase subclínica, tras el tratamiento con dipropionato de imidocarb.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE EHRLICHIA

El género Ehrlichia se designó como tal en 1945 en honor a Paul Ehrlich (Moshkovski, 1945; Silverstein, 1998). *Ehrlichia canis* fue descrita en 1935 por Donatien y Lestoquard, aunque fue denominada *Rickettsia canis*. Estos autores también describen en 1936 *E. bovis* con la denominación *Rickettsia bovis*. Parece ser que *E. phagocytophila* fue descrita por Tyzzer en 1938 como *Cytoecetes microciti*; sin embargo no existe material original ni cultivos que verifiquen su identidad (Ristic et Huxsoll, 1984). Con posterioridad se han ido describiendo otras especies *Neorickettsia helminthoeca* (Philip et al, 1953), *E. sennetsu* (Misao y Kobayashi, 1955), *E. equi* (Lewis et al, 1975), *E. platys* (French y Harvey, 1983), *E. risticii* (Holland et al, 1985b), *E. chaffeensis* (Anderson et al, 1991), *E. ewingii* (Anderson et al, 1992) y *E. muris* (Wen et al, 1995).

En 1957, Philip reagrupa los géneros *Ehrlichia* (especie tipo *Ehrlichia canis*), *Cowdria* y *Neorickettsia* en la tribu *Ehrlichieae* (familia *Rickettsiaceae*, orden *Rickettsiales*) (Ristic y Kreier, 1984). En 1980, la nomenclatura de *Ehrlichieae*, *Ehrlichia* y *Ehrlichia canis* es incorporada a la Lista aprobada de nombres bacterianos, lo que les confiere el estatus de nomenclaturas públicamente válidas.

La clasificación taxonómica clásica se basaba en las características morfológicas, ecológicas y epidemiológicas de las bacterias y en las manifestaciones clínicas de la enfermedad que producen (Dumler et al, 2001). El avance en técnicas científicas de clasificación genética, mucho más objetivas, tales como el análisis de secuencias de nucleótidos de genes o de aminoácidos de proteínas de membrana externa y los análisis antigénicos, han llevado a la reorganización taxonómica de estos y otros muchos agentes bacterianos y han demostrado la imperfección de la anterior clasificación taxonómica. (Weisburg et al, 1991; Woese et al, 1990; Brenner et al, 1993).

Ningún sistema de clasificación microbiológica es perfecto. Sin embargo, la clasificación genética de los microorganismos es óptima en lo que se refiere a su capacidad de predecir los comportamientos biológicos y la enfermedad producida por los agentes infecciosos incluidos en el mismo grupo (Dumler *et al*, 2001).

Basándose en los resultados obtenidos de las secuencias del gen 16S rRNA y groESL y de los análisis antigénicos (Sumner *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1997), Dumler *et al* en 2001 en un artículo publicado en el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology proponen una reorganización de estas especies a través de la eliminación de las tribus de la familia *Rickettsiaceae* y la incorporación de las especies de la anteriormente denominada tribu *Ehrlichieae* a la familia *Anaplasmataceae*. Así los géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* y *Neorickettsia* se incorporan a la Familia *Anaplasmataceae* dentro del orden *Rickettsiales* y del Phylum *Proteobacteria*.

Basándose en la secuencia del gen 16S rRNA, las especies anteriormente incluidas en los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* y *Neorickettsia* se reorganizarían en cuatro grupos genéticos (Dumler *et al*, 2001):

- Grupo 1: amplía el género *Anaplasma*, incluyendo en él: además de las especies hasta entonces incluidas *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma caudatum*; las siguientes especies *Ehrlichia phagocytophila* (hoy llamada *Anaplasma phagocytophilum*), *Ehrlichia bovis* (actualmente *Anaplasma bovis*) y *Ehrlichia platys* (hoy *Anaplasma platys*). La especie tipo es *A. Marginale*.
- Grupo 2: El género *Ehrlichia* se amplía con la inclusión de *Cowdria ruminantium* (ahora *Ehrlichia ruminantium*). La especie tipo es *E. canis*; otras especies de este género son *E. chaffeensis*, *E. Ewingii* y *E. Muris*.
- Grupo 3: El género *Neorickettsia*, cuya especie tipo es *N. helminthoeca*, quedaría ampliado al incluirse en el mismo las especies *Ehrlichia risticii* y *Ehrlichia sennetsu* (que pasan a denominarse *N. risticii* y *N. sennetsu* respectivamente).

- Grupo 4: la especie *Wolbachia pipientis* será el único miembro del género *Wolbachia*.

Existe una elevada reacción antigénica cruzada entre las especies del mismo grupo, ya que comparten varios antígenos superficiales homólogos; sin embargo, entre las especies de los diferentes grupos esta reacción antigénica cruzada es mucho menor (Yu *et al*, 2000; Dumler *et al*, 2001)

La especie actualmente denominada *Anaplasma phagocytophilum* engloba tres especies anteriormente descritas, denominadas *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH). Se ha observado tras los pertinentes estudios genéticos y biológicos que existen suficientes similitudes entre ellas como para clasificarlas en una única especie (Anderson *et al*, 1991; Dumler *et al*, 1995; Sumner *et al*, 1997).

La clasificación actual del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity *et al* 2001), es similar a la propuesta por Dumler y colaboradores, si bien incluye los géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* y *Neorickettsia* dentro de la familia *Ehrlichiaeae*, en lugar de en la familia *Anaplasmataceae*.

Todos los miembros de la familia *Ehrlichiaeae* son bacterias intracelulares obligadas que se replican en el interior de una vacuola intracitoplasmática derivada de la membrana externa de la célula eucariota hospedadora. Son organismos de cocoides a elipsoides, a menudo pleomórficos, pequeños y gram-negativos que residen en vacuolas citoplásmicas, formando inclusiones únicas o, más habitualmente compactas (mórulas) (Theiler, 1910; Moshkovski, 1945; Ristic y Huxsoll, 1984; Ristic y Kreier, 1984; Dumler *et al*, 2001). Ultraestructuralmente existen dos morfologías: grandes células reticuladas y formas más pequeñas de protoplasma condensado denominadas en inglés dense-core forms (Popov *et al*, 1998).

Los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Neorickettsia* se multiplican en células hematopoyéticas maduras o inmaduras de hospedadores vertebrados. *Wolbachia* infecta exclusivamente a invertebrados, no habiéndose detectado infección en ningún organismo vertebrado.

Las especies ehrlichiales incluidas en los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son transmitidas por picadura de garrapatas. Las especies incluidas en los géneros *Neorickettsia* y *Wolbachia* son transmitidas por cercarias o metacercarias de helmintos que infectan serpientes, peces, insectos acuáticos o artrópodos (Rikihisa, 1991; Barlough *et al*, 1998; Pusterla *et al*, 2000). En el caso de las especies del género *Neorickettsia* la infección de hospedadores vertebrados superiores se produciría por ingestión de peces o invertebrados portadores del agente (Barlough *et al*, 1998; Madigan *et al*, 2000a; Pusterla *et al*, 2000).

2.2. ESPECIES DEL GÉNERO *Ehrlichia* Y GÉNEROS PRÓXIMOS QUE AFECTAN A LOS CÁNIDOS

Aunque las *Ehrlichias* fueron descritas a principios del siglo pasado, se consideraron patógenos de gran importancia veterinaria en la penúltima década del siglo XX. Debido a los cambios taxonómicos anteriormente descritos, en la actualidad, se denomina ehrlichiosis a la enfermedad producida por las especies incluidas en los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*. No obstante, la infección por agentes de los dos últimos géneros se está comenzando a llamar anaplasmosis (Shaw, 2003) y neorickettsiosis (Chae *et al*, 2002), respectivamente.

2.2.1. GÉNERO EHRLICHIA

Dentro del género *Ehrlichia*, cuya especie tipo es *Ehrlichia canis*, se encuentran incluidas las especies *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium* y *E. muris*. Se han observado infecciones en perros con todas estas especies, excepto con *E. muris* (Breitschwerdt *et al*, 1998a; Allsopp y Allsopp, 2001; Suksawat *et al*, 2001).

La primera ehrlichiosis canina descrita, así como la más universalmente conocida, es aquella producida por *Ehrlichia canis*. Comenzaremos con una breve descripción de la misma, para pasar a describir otras especies que se han identificado como infectivas en los cánidos.

La **ehrlichiosis monocítica canina** (EMC) fue reconocida por primera vez en Argelia, en el Instituto Pasteur en 1935 (Donatien y Lestoquard, 1935), ante la presencia de una enfermedad febril, que condujo a la muerte a 4 de 5 perros parasitados intensamente

por garrapatas. En los frotis de sangre de esos perros se observaron unos agregados granulares compatibles con *Rickettsia* en el interior de monocitos. El agente patógeno fue denominado *Rickettsia canis*. Moshkovskii en 1945 red denominó a este agente *Ehrlichia canis* en honor al bacteriólogo alemán Paul Ehrlich. En los años 40 se describen diversas infecciones por este agente en África e India, en los años 50 en las Antillas Holandesas y a partir de los años 60 se describe la enfermedad en Singapur, Vietnam, Estados Unidos y Europa (Ewing, 1969)

En la década de los 60, perros militares destacados en Vietnam sufrieron una enfermedad caracterizada por hemorragias, emaciación y una elevada mortalidad. Este proceso se denominó pancitopenia tropical canina y posteriormente su etiología se atribuyó a *E. canis* (Keefe *et al*, 1982). Desde entonces ha sido reconocida mundialmente como una importante enfermedad infecciosa para perros y otros cánidos. *E. canis* produce una enfermedad febril aguda que puede progresar a cuadros clínicos más graves e incluso mortales (Skotarczak, 2003).

Ehrlichia canis es transmitida a través de la picadura de garrapatas, siendo la especie responsable de esta transmisión *Rhipicephalus sanguineus*, la garrapata marrón del perro. La ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial, existiendo áreas consideradas endémicas de la enfermedad. En Turquía se ha estimado una prevalencia del 8 al 20 % según las zonas (Batmaz *et al*, 2001). En España en la Comunidad de Madrid, Sainz *et al* en 1994 determinan una prevalencia del 6.5%, apreciándose una gran variación en cuanto al número de casos observados en función de que el hábitat sea urbano o rural, lo cual muestra la dependencia de la infección del grado de exposición a las garrapatas (Sainz *et al*, 1998a).

Recientemente *E. canis* o un organismo indistinguible de ella ha sido aislado de un humano en Venezuela, por lo que el riesgo zoonótico de este agente parece confirmarse (Pérez *et al*, 1996).

Ehrlichia ewingii es uno de los agentes responsable de la **ehrlichiosis granulocítica canina** (EGC), que infecta neutrófilos y más raramente, eosinófilos caninos. Fue descrita por primera vez en 1971 (Ewing, 1971), aunque su denominación se debe a Anderson en 1992 (Anderson *et al*, 1992). La garrapata vector es *Amblyomma americanum* (Wolf *et al*, 2000), de distribución exclusiva en los Estados Unidos por lo que esta infección se considera actualmente restringida a esta área geográfica (Anderson *et al*, 1993; Maretzki *et al*, 1994; Goldman *et al*, 1998; Magnarelli *et al*, 1999; Murphy *et al*, 1998; Goodman *et al*, 2003). Sin embargo, recientemente se ha observado la infección natural de este agente en otras especies de garrapatas como, *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis* en Oklahoma (Murphy *et al*, 1998).

La enfermedad puede cursar sin sintomatología o presentar un cuadro leve con signos variados, caracterizado en general por fiebre, letargia, anorexia y pérdida de peso. Con cierta frecuencia se presenta con poliartritis neutrofílica e incluso con signos neurológicos como ataxia, parexia, déficit de propiocepción, anisocoria, etc. La alteración hematológica más frecuente es trombocitopenia, pudiéndose observar también anemia. (Goldman *et al*, 1998; Goodman *et al*, 2003). En líneas generales, la enfermedad que produce es más leve que la producida por *Ehrlichia canis* (Madewell y Gribble, 1982).

La ehrlichiosis granulocítica canina es también producida por la actualmente denominada *Anaplasma phagocytophilum*. En Europa los casos descritos de EGC son exclusivamente atribuidos a *A. phagocytophilum* (Johansson *et al*, 1995; Pusterla *et al*, 1998; Massung *et al*, 2000).

Ehrlichia ewingii presenta una fuerte reacción serológica cruzada con *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* si bien la seroreactividad con *A. phagocytophilum* es mucho más débil (Buller *et al*, 1999; Wolf *et al*, 2000; Paddock *et al*, 2001).

Tanto *Ehrlichia ewingii* como *A. phagocytophilum* son especies responsables de la ehrlichiosis granulocítica humana.

Ehrlichia chaffeensis, agente causal de la **ehrlichiosis monocítica en personas**, es capaz de infectar a los perros de manera natural y dar lugar a una enfermedad grave, clínica y serológicamente indistinguible de la causada por *E. canis* o *E. ewingii* (Breitschwerdt *et al*, 1998a). La infección experimental produce una ligera respuesta febril sin anomalías hematológicas (Dawson y Ewing, 1992), por lo que el perro no se considera un buen modelo como animal de experimentación en esta infección.

La garrapata *Amblyomma americanum* se considera el principal vector de *E. chaffeensis*, siendo los ciervos los reservorios principales de esta ehrlichia en la naturaleza (Anderson *et al*, 1993; Dawson *et al*, 1994). Debido a la distribución geográfica del vector, sólo se han descrito casos de ehrlichiosis canina por *E. chaffeensis* en Estados Unidos (Kordick *et al*, 1999). En casos de infección natural en perros por *E. chaffeensis*, el tratamiento con doxiciclina no es efectivo, por lo que se recomienda el empleo de dipropionato de imidocarb (Breitschwerdt *et al*, 1998b).

Ehrlichia ruminantium es el agente causal de la **ehrlichiosis de los rumiantes**, también llamada enfermedad del corazón acuoso, debido a que produce hidropericardio (Uilenberg *et al*, 1993). Esta ehrlichia infecta las células endoteliales, células de la línea mieloblástica y células de la línea monoblástica de los rumiantes. Su transmisión se realiza por garrapatas vectores del género *Amblyomma spp*. La distribución de la enfermedad, ligada a la de su vector, se ha limitado al continente africano, aunque la exportación de animales afectados ha podido distribuir la enfermedad a otras zonas, como el Caribe (Bezuidenhout, 1987; Walker y Olwage, 1987; Camus y Barre, 1993; Deem, 1998). En Sudáfrica se ha descrito la existencia tanto de perros sanos portadores de la bacteria, como de animales enfermos con ehrlichiosis causada por *E. ruminantium* (Allsopp y Allsopp, 2001). El hallazgo de un genotipo de *E. ruminantium* que infecta perros enfatiza la multiplicidad de organismos que las técnicas moleculares han sido capaces de revelar en el género *Ehrlichia* (Allsopp y Allsopp, 2001).

Ehrlichia muris se aisló en 1983 del bazo de un roedor salvaje en Japón (Kawahara *et al*, 1993), asignándose esta denominación en 1995 (Wen *et al*, 1995).

Ehrlichia muris se ha aislado de la garrapata *Haemaphysalis flava* siendo probable su papel como vector, esta garrapata tan sólo se ha identificado hasta el momento en Japón y en Corea. El poder patógeno de esta bacteria se desconoce. La inoculación experimental de este agente en perros vía intravenosa no produjo sintomatología, observándose tan sólo una ligera y fugaz elevación del título de anticuerpos. Mediante controles serológicos se ha detectado la exposición a este agente o a alguno similar en hombres, perros y otros animales (Kawahara *et al*, 1999).

2.2.2. GÉNERO ANAPLASMA

El género *Anaplasma*, según la última clasificación del Bergey's manual (Garrity *et al*, 2001), incluye las siguientes especies: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum*, siendo las dos últimas especies las únicas de relevancia en medicina canina.

Anaplasma platys es el agente de la **trombocitopenia cíclica infecciosa del perro**. Esta *Ehrlichia* infecta exclusivamente plaquetas, no habiéndose encontrado en otro tipo de células. Se considera que la infección por este agente es específica del perro. La transmisión de la infección se produce a través de la picadura de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Simpson *et al*, 1991), las transfusiones sanguíneas con sangre infectada también podrían transmitir la infección (Woody *et al*, 1991; Breitschwerdt, 2003). La infección se ha descrito en EEUU, Venezuela, Asia (China, Taiwan, Japón), Israel, Australia y Europa, principalmente en España, Grecia, sur de Francia, Alemania e Italia (Kontos *et al*, 1991; Chang *et al*, 1996; McBride *et al*, 1996; Harvey, 1998; Sainz *et al*, 1999a; Brown *et al*, 2001; Motoi *et al*, 2001).

La infección es a menudo inaparente, pero tras una incubación de 8 a 15 días, puede producirse fiebre, adenopatía generalizada, leucopenia, anemia moderada, hipergammaglobulinemia moderada, hipoalbuminemia, hipocalcemia y especialmente trombocitopenia. La trombocitopenia se sucede en episodios de 3-4 días y a intervalos de 7-21 días, de ahí que a la enfermedad se le haya denominado "Trombocitopenia cíclica

infecciosa del perro”. Los valores mínimos de plaquetas se observan en el primer episodio, siendo posible visualizar numerosas plaquetas infectadas en los frotis sanguíneos. A pesar de la disminución del número de plaquetas, es rara la aparición de hemorragias espontáneas, si bien se han descrito hemorragias graves tras cirugía o traumatismo intenso. Con el tiempo la trombocitopenia cíclica da paso a una trombocitopenia crónica de lenta recuperación (Harrus *et al*, 1997). Las cepas griega e israelita son más agresivas y producen un cuadro caracterizado por fiebre elevada (41,5°C), anorexia, apatía, debilidad, palidez de mucosas y hemorragia (petequias en mucosas y lesiones hemorrágicas cutáneas) (Kontos *et al*, 1991).

En 1986, Glaze et Gaunt describieron un caso de uveitis bilateral en un perro infectado por *Anaplasma platys* sin presentar signo clínicos susceptibles de otras enfermedades responsables de uveitis en el perro (blastomycosis, histoplasmosis, criptococosis, toxoplasmosis, brucelosis, linfosarcoma...). Coinfecciones de *Anaplasma platys* con otros agentes como *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* se han descrito en Tailandia, Venezuela y España (Sainz *et al*, 1999b; Suksawat *et al*, 2001).

Anaplasma phagocytophilum comprende actualmente las especies anteriormente denominadas como *Ehrlichia phagocytophyla*, *Ehrlichia equi* y el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica humana. Estudios genéticos determinaron la consideración de estos tres agentes como una única especie (Dumler *et al*, 2001). Este agente es capaz de infectar los leucocitos granulocíticos de un gran número de especies diferentes como caballos, pequeños rumiantes, hombres, perros e incluso gatos (Dumler *et al*, 1995; Johansson *et al*, 1995; Engvall *et al*, 1996; Parola *et al*, 1998; Bjorsdorff, 1999a; Magnarelli, 1999; Madigan y Pusterla, 2000), produciendo ehrlichiosis granulocítica en la especie infectada.

La ehrlichiosis granulocítica equina fue diagnosticada por primera vez en Suecia en 1989 (Van der Kolk, 1993). La ehrlichiosis granulocítica humana se diagnosticó por vez primera en 1994 en Estados Unidos (Bakken *et al*, 1994).

A. phagocytophylum se transmite principalmente por la garrapata *Ixodes ricinus*. Este agente está ampliamente distribuido en Europa (Pusterla *et al*, 1998) y en Estados Unidos (Greig *et al*, 1996; Magnarelli *et al*, 1997; Goldman *et al*, 1998). Los pequeños mamíferos son hospedadores comunes de los estadios inmaduros de *Ixodes ricinus*, por lo que se sospecha que puedan ser reservorios naturales de *A. phagocytophylum* (Liz *et al*, 2000).

En rumiantes, la enfermedad se caracteriza por fiebre y leucopenia severa (Taylor, 1941) debida a una linfopenia temprana y a una trombocitopenia y neutropenia prolongada con una reducción significativa en la reactividad linfocitaria durante el periodo de rickettsiemia que predispone a otras enfermedades bacterianas y virales más graves (Woldehiwet y Scott, 1982a; Woldehiwet y Scott, 1982b; Woldehiwet, 1987; Larsen *et al*, 1994; Gokce y Woldehiwet, 1999).

En équidos, la enfermedad cursa de manera semejante con fiebre, anorexia, depresión, edema de extremidades, trombocitopenia, leucopenia y anemia (Gribble, 1969).

La verdadera incidencia de *A. phagocytophylum* en perros es desconocida, sin embargo, se considera que en áreas donde esta ehrlichiosis es endémica, en otras especies animales, puede representar un elevado porcentaje de la ehrlichiosis granulocítica canina (Greig *et al*, 1996; Magnarelli *et al*, 1997; Goldman *et al*, 1998). La enfermedad en perros cursa con sintomatología muy inespecífica como anorexia, letargia, fiebre y trombocitopenia. No existen signos clínicos únicos atribuibles a esta ehrlichiosis y otros signos como conjuntivitis, cojeras o ataxia han sido descritos, aunque mucho menos frecuente que en la ehrlichiosis granulocítica canina producida por *E. ewingii* (Greig *et al*, 1996; Tarello, 2003). Se ha descrito una predisposición de las hembras a padecer esta ehrlichiosis (Greig *et al*, 1996) en contraste con la ehrlichiosis granulocítica por *E. ewingii*, en la que se ha registrado una predisposición de los machos a la enfermedad (Cohn, 2003).

2.2.3. GÉNERO NEORICKETTSIA

Las especies de este género se caracterizan porque su transmisión no se produce a través de una garrapata vector, sino a través de trematodos o nematodos que infestan caracoles, peces o insectos, de tal manera que la transmisión a vertebrados superiores se produce por ingestión de estos (Burg *et al*, 1994; Palmer y Benson, 1994; Chae *et al*, 2000; Pusterla *et al*, 2000; Madigan *et al*, 2000; Chae *et al*, 2002).

Neorickettsia risticii es el agente de la ehrlichiosis monocítica equina o fiebre de Potomac equina (Holland *et al*, 1985a). La infección se ha identificado en Estados Unidos, Canadá, Uruguay, Brasil y seguramente exista en numerosos países de Europa (Van der Kolk *et al*, 1993; Magnarelli y Anderson, 1993; Sainz *et al*, 1999a; Dutra *et al*, 2001). La enfermedad se caracteriza por fiebre, anorexia, edema de extremidades y sintomatología digestiva con diarrea. La tasa de mortalidad en los caballos puede llegar al 30% (Dutra *et al*, 2001). También se han descrito abortos asociados a esta enfermedad (Long *et al*, 1995 a; Long *et al*, 1995b).

En 1988, se demostró que los perros eran susceptibles a la infección experimental por este agente (Ristic *et al*, 1988). Posteriormente se han descrito casos de infección natural en perros, denominándose la enfermedad en estos ehrlichiosis canina atípica (Kakoma *et al*, 1991; Kakoma *et al*, 1994). El curso de esta patología es muy semejante al de la ehrlichiosis canina clásica.

Neorickettsia sennetsu fue la primera ehrlichia identificada como patógena para el hombre (Misao y Kobayashi, 1955) La enfermedad producida por este agente parece estar limitada a Japón. La transmisión está ligada al consumo de pescado crudo infestado por cercarias de trematodos, por lo que los hábitos alimenticios condicionan la aparición de la enfermedad (Fukuda y Yamamoto, 1981; Rikihisa, 1991a).

Neorickettsia helminthoeca es la especie tipo del género. Este agente produce la enfermedad del envenenamiento por salmón, que ha sido reproducida experimentalmente en perros (Rikihisa *et al*, 1991).

En resumen, históricamente la infección con especies de *Ehrlichia* se consideraba específica de hospedador, sin embargo, estudios recientes revelan la capacidad de una misma especie para infectar a una amplia variedad de hospedadores. También, se ha observado la existencia de infecciones ehrlichiales múltiples en un mismo hospedador tanto en humanos como en perros (Breitschwerdt *et al*, 1998a; Meinkoth *et al*, 1998; Kordick *et al*, 1999; Sainz *et al*, 1999b; Suksawat *et al*, 2001)

Pese a que en perros se ha descrito la infección con *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium*, *A. phagocytophylum*, *A. platys*, *N. sennetsu* y *N. risticii*, tan sólo *E. canis* ha sido descrita como patógeno de distribución mundial.

2.3. EHRLICHIOSIS HUMANA

2.3.1. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Hacia finales del siglo XIX se comenzó a comprender la importancia de las garrapatas como potenciales transmisores de enfermedades. Entre las enfermedades transmitidas por garrapatas se encuentran aquellas producidas por especies ehrlichiales.

La Ehrlichiosis es el nombre genérico que reciben las enfermedades producidas por varias especies bacterianas pertenecientes a los géneros de la familia *Ehrlichaceae*. Durante décadas han sido identificados patógenos de esta familia que producían enfermedad en diferentes especies animales (perros, vacas, ovejas, cabras y caballos), así como en el hombre. Concretamente, en la actualidad se conocen 3 especies de *Ehrlichia* que son agentes causales de enfermedad en humanos en Estados Unidos y una especie en Japón. La ehrlichiosis humana en Estados Unidos se refiere a las enfermedades producidas por tres especies diferentes de ehrlichia: *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y el agente de la ehrlichiosis humana granulocítica, actualmente identificado como *Anaplasma phagocytophylum* (Maeda *et al*, 1987; Bakken *et al*, 1994; Buller *et al*, 1999).

Históricamente, fue en 1953 cuando se identificó la primera especie de ehrlichia capaz de producir enfermedad en humanos; concretamente, fue en Japón y se trataba de *Ehrlichia sennetsu*, actualmente *Neorickettsia sennetsu* (Misao y Kobayashi, 1955). En 1981-1982 hubo un resurgimiento remarcable de casos de esta enfermedad en la misma zona, después de varios años de virtual ausencia. La enfermedad se ha descrito en el lejano Este y en el Sudeste asiático, y la mayoría de los casos han sido descritos en el oeste de

Japón, siendo muy rara en otras latitudes (Rapmund, 1984). En 1985 un estudio serológico de 200 pacientes en Malasia aquejados de fiebre de origen desconocido reveló que un 29% de ellos presentaban anticuerpos frente a *E. sennetsu*, lo que indicaba la existencia de una alta prevalencia de esta enfermedad en el Sudeste Asiático (Ristic *et al*, 1990). La transmisión de esta enfermedad está relacionada con el consumo de pescado crudo infestado con parásitos portadores de la bacteria (Fukuda y Yamamoto, 1981; Rikihisa, 1991).

En 1986, el estudio de las ehrlichiosis humanas sufrió un espectacular avance debido a la descripción del primer caso de **ehrlichiosis monocítica humana** (EMH) en los EEUU, en un paciente con sintomatología compatible con Fiebre de las Montañas Rocosas. Este paciente fue negativo serológicamente a *Rickettsia rickettsii* y dos semanas antes había estado en Arkansas expuesto a picaduras de garrapatas. En este paciente se observaron en la fase aguda de la enfermedad inclusiones intracitoplasmáticas en monocitos, cuyo estudio ultraestructural reveló la existencia de pequeñas bacterias cocoides compatibles con mórulas de *Ehrlichia*. Un análisis serológico frente a *E. canis* resultó ser positivo, por lo que se pensó en la emergencia de una nueva zoonosis (Maeda *et al*, 1987).

Si bien inicialmente se pensaba que el agente causal de esta nueva ehrlichiosis era *E. canis*, en 1990 Dawson y colaboradores consiguieron aislar al agente etiológico de esta enfermedad de un paciente con sintomatología leve en Fort Chaffee (Dawson *et al*, 1991). El agente fue caracterizado a través de análisis de secuencia del gen 16S rRNA y se denominó *E. chaffeensis* (Anderson *et al*, 1991). Desde entonces esta enfermedad considerada como anecdótica ha ido cobrando importancia al diagnosticarse en cada vez más pacientes afectados por infestaciones por garrapatas, no sólo en Estados Unidos sino en otras regiones del mundo. De 1985 a 1990 se examinaron 237 pacientes seropositivos a *E. canis* o *E. chaffeensis* en 21 estados de Norteamérica (Fishbein *et al*, 1994). Se han diagnosticado serológicamente casos de ehrlichiosis monocítica humana (EMH) en Portugal (Morais *et al*, 1991), Mali (Uhaa *et al*, 1992), Bélgica (Rikihisa, 1999) y China (Wen *et al*, 2003). Sin embargo, el principal vector de la enfermedad es una especie

americana de garrapata, *Amblyomma americanum*, por lo que algunos autores consideran que realmente no se ha documentado ningún caso de ehrlichiosis humana por *E. chaffeensis* fuera de Estados Unidos (Brouqui y Dumler, 2000).

En EEUU se diagnosticaron 742 casos de ehrlichiosis monocítica humana hasta 1997 y el número de casos registrados anualmente ha ido en aumento (McQuiston *et al*, 1999; Olano *et al*, 2003), algunos de ellos mortales (Paddock *et al*, 1997). El número de infectados es probablemente superior al de afectados debido a la posible existencia de numerosos casos subclínicos (Rikihisa, 1999). Un estudio prospectivo de la enfermedad en Cape Girardeau, en el Sudeste de Missouri, reveló una incidencia provisional de 11 casos por 100.000 habitantes en 1998 (Olano *et al*, 2003). Otros estudios han revelado que la EMH es incluso más prevalente que la Fiebre de las montañas rocosas en estados como Carolina del Norte, donde ésta última es endémica (Carpenter *et al*, 1999).

En 1994 en el norte de Minnesota y Wisconsin se describió por primera vez una nueva entidad clínica, la **ehrlichiosis granulocítica humana** (EGH) a partir de seis pacientes con enfermedad febril en los que se observó, en el interior de granulocitos de sangre periférica y en granulocitos esplénicos de una persona que murió, la existencia de mórulas intracitoplasmáticas sugerentes de infección por *Ehrlichia spp.* (Bakken *et al*, 1994; Chen *et al*, 1994). Estudios sobre la secuencia de nucleótidos del gen rRNA 16S de este agente causal mostraron una fuerte homología con dos conocidos agentes de la enfermedad en Veterinaria: *Ehrlichia equi*, agente de la ehrlichiosis equina y *Ehrlichia phagocytophila*, agente de la fiebre de la garrapata en rumiantes. De hecho, en la actualidad los tres agentes han sido considerados como miembros de la misma especie que se ha pasado a denominar *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al*, 2001).

Desde su aparición en 1994, se han descrito casos de ehrlichiosis granulocítica humana en diferentes estados de Norteamérica, principalmente del medio oeste y del noreste. Aunque los datos son limitados, estudios en el norte del medio oeste sugieren una incidencia de 1 a 58 casos por cada 100.000 habitantes, (Bakken *et al*, 1996). Desde 1995, se ha notificado la evidencia serológica de ehrlichiosis granulocítica humana en varios

países europeos como Suiza (Pusterla *et al*, 1999), en áreas endémicas de enfermedad de Lyme por *Borrelia burgdorferi*. Además, se han documentado casos de infección humana con especies granulocíticas de *Ehrlichia* en Eslovenia (Petrovec *et al*, 1997; Lotric-Furlan *et al*, 2001), Holanda (Van Dobbenburgh *et al*, 1999) y Suecia (Bjorsdorff *et al*, 1999a).

Hasta la fecha más de 600 pacientes con EGH han sido identificados en USA y Europa (Gewirtz *et al*, 1996; Foley *et al*, 1999; McQuiston *et al*, 1999; Bakken y Dumler, 2000). En Agosto de 1999 un caso de EGH fue descrito en el Hospital de la Rioja en nuestro país (Oteo *et al*, 2000).

Un estudio retrospectivo reciente señala que se dan el doble de casos de ehrlichiosis granulocítica humana que de ehrlichiosis monocítica humana, casos de otras ehrlichiosis son prácticamente anecdóticos (Gardner *et al*, 2003)

Recientemente se ha descrito la infección por *Ehrlichia ewingii*, el agente etiológico de la ehrlichiosis canina granulocítica, en el hombre, presentándose la mayoría de los casos descritos en pacientes con inmunodeficiencia. (Buller *et al*, 1999; Paddock *et al*, 2001). La enfermedad se caracteriza por un cuadro febril que cursa con dolor de cabeza, mialgias y trombocitopenia.

En 1990 se observó que los monocitos humanos son susceptibles de infección por *E. canis*, por lo que se considero posible la infección de personas por *E. canis* (Ristic *et al*, 1990). Con posterioridad, *E. canis* se ha aislado de una persona sana, un veterinario en Venezuela (Pérez *et al*, 1996), comprobándose genéticamente la identidad de esta ehrlichia (Unver *et al*, 2001).

En 1999, se describe la existencia de infección en un humano por un agente similar a *E. platys* (Arraga-Alvarado *et al*, 1999).

También se han descrito coinfecciones de ehrlichiosis monocítica humana con babesiosis y borreliosis (Magnarelli *et al*, 1998; Javed *et al*, 2001).

2.3.2 CUADRO CLÍNICO

El cuadro clínico de la ehrlichiosis humana es bastante inespecífico y se caracteriza por fiebre, malestar general, cefalea, mialgias, náuseas y anorexia (Peterson *et al*, 1989; Eng *et al*, 1990; Ristic, 1990). Posteriormente aparece linfadenopatía y en un 30% de los casos se describen erupciones cutáneas y sintomatología digestiva. También se pueden observar cuadros neurológicos y respiratorios según la gravedad del proceso (Harkess *et al*, 1989; Eng *et al*, 1990; Rohrbach *et al*, 1990; Harkess, 1991; Bakken y Dumler, 2000). A nivel laboratorial se observa trombocitopenia, leucopenia y anemia (Pearce *et al*, 1988; Eng *et al*, 1990; Bakken *et al*, 1996). El cuadro clínico y lesional es muy semejante al observado en el curso de la ehrlichiosis canina.

Independientemente de la especie causante de la ehrlichiosis, el cuadro clínico puede variar de asintomático a fatal. Sin embargo, se debe reconocer que la ehrlichiosis monocítica humana causada por *E. chaffeensis* es la más grave (Maeda *et al*, 1987; Fichtenbaum *et al*, 1993; Fishbein *et al*, 1994; Paddock y Childs, 2003). Esta enfermedad se ha asociado con síndrome de dificultad respiratoria grave en adultos y meningoencefalitis incluso en pacientes inmunocompetentes (Ratnasamy *et al*, 1996; Vugia *et al*, 1996; Weaver *et al*, 1999; Patel *et al*, 1999), si bien es en pacientes con la inmunidad comprometida donde la enfermedad es mucho más grave, incluso mortal (Manian *et al*, 1989; Paddock *et al*, 1993; Marty *et al*, 1995; Anthony *et al*, 1995; Sadikot *et al*, 1999).

E. ewingii ha sido asociada con enfermedad principalmente en personas inmunodeprimidas (Buller *et al*, 1999). Mientras que la ehrlichiosis granulocítica humana producida por *A. phagocytophilum* suele causar una enfermedad más leve.

En resumen, se ha podido constatar la infección en humanos con, al menos, 5 especies diferentes de *Ehrlichia*: *Anaplasma phagocytophilum*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. canis* y *Neorickettsia sennetsu*. (Everett *et al*, 1994; Fishbein *et al*, 1994; Bakken *et al*, 1996; Buller *et al*, 1999; Winslow *et al*, 2000; Olano *et al*, 2003).

2.3.3. CONCURRENCIAS

La presentación de enfermedades concomitantes, principalmente enfermedades que inmunocomprometen al individuo, en personas previamente infectadas por *Ehrlichia spp.* pueden generar la aparición del cuadro clínico o acrecentar la gravedad del mismo. Así, desde la primera descripción del SIDA en humanos se han ido incrementando los casos de personas afectadas por esta enfermedad en las que otras infecciones concomitantes hacen estragos. La primera concurrencia entre infección por SIDA y *E. chaffeensis* fue descrita en 1993, otras descripciones posteriores han sido esporádicas (Paddock *et al*, 1993; Martin *et al*, 1999). En personas infectadas con el virus del SIDA la infección por *E. chaffeensis* suele ser mortal (Paddock *et al*, 1993; Paddock *et al*, 1997; Martin *et al*, 1999).

Entre 1992 y 2000, 21 pacientes con SIDA fueron diagnosticados de ehrlichiosis, 17 de ellos en los EEUU entre 1997 y 2000 (Paddock, 2001), 20 individuos (95%) eran hombres con una edad media 31-56 años. El diagnóstico de la ehrlichiosis en personas infectadas por SIDA se ve dificultado por la similitud del cuadro clínico de ehrlichiosis con la sintomatología propia de las complicaciones de la enfermedad. En la población infectada exclusivamente por SIDA es frecuente encontrar alteraciones hematológicas como citopenias, lo que supone que los hallazgos hematológicos, considerados significativos de ehrlichiosis en la población normal, sean más sutiles y más sujetos a confusión en los individuos afectados por el SIDA (Perkocha y Rodgers, 1988; Sloand *et al*, 1992; Everett *et al*, 1994)

También se han diagnosticado infecciones concurrentes de HGE y otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la enfermedad de Lyme (Bakken *et al*, 1996; Nadelman *et al*, 1997), aunque el número de casos es reducido. El agente causal de

la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, comparte el mismo vector en Europa y en los EEUU (Ostfeld, 1997) que *Anaplasma phagocytophilum*: las garrapatas del género *Ixodes* (Bakken *et al*, 1994; Reed *et al*, 1995; Telford *et al*, 1996; Schwartz *et al*, 1997). Debido a ello, parece lógico que las áreas geográficas donde se ha descrito la EGH se corresponden estrechamente con las zonas endémicas de enfermedad de Lyme (Centers of disease control and Prevention, 1996; Dumler *et al*, 1995; Kitron *et al*, 1997).

En resumen, la existencia de infecciones en humanos por ehrlichias consideradas anteriormente exclusivas de animales, la presencia en la mayoría de los casos de infecciones subclínicas, el desarrollo de enfermedad grave, incluso mortal, en individuos inmunodeprimidos y el auge de enfermedades y tratamientos que contribuyen a la inmunosupresión del individuo (SIDA, tratamientos quimioterápicos), hacen de estas enfermedades, hasta hace unos años consideradas anecdóticas un importante objeto de estudio.

2.4. EHRLICHIOSIS EN ESPAÑA

La primera descripción bibliográfica de ehrlichiosis canina en España data de 1988 y fue realizada en Cataluña (Font *et al*, 1988). Desde entonces y de forma especial en estos últimos años, esta enfermedad ha sido diagnosticada de un modo rutinario por los clínicos veterinarios de toda España.

Distintos estudios señalan que la presencia de garrapatas es un factor predisponente para el desarrollo de infección por *Ehrlichia spp.* (Nims *et al* 1971; Botros *et al* 1995). A lo largo de la geografía española se pueden encontrar *Rhipicephalus spp.*, *Ixodes spp.* y *Dermacentor spp.* (Estrada, 1994). La ehrlichiosis canina está extendida por la práctica totalidad del territorio nacional, hecho que se puede deber a que la garrapata más ubicua y frecuente del territorio español es precisamente el vector de *E. canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, la cual en muchos áreas es la única existente (Cordero del Campillo, 1980; Herrero *et al*, 1992; Olmeda *et al*, 1993; Prieto *et al*, 1999).

Los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento son escasos si bien todos ellos revelan una importante seroprevalencia en las distintas áreas analizadas. En la Comunidad de Madrid, la prevalencia es del 6,5% (Sainz *et al*, 1998a). En Castilla-León, posiblemente como consecuencia del hábitat, la prevalencia es mayor, 19,2% y variable dependiendo de las provincias (Sainz *et al*, 1996). En Valencia la tasa de prevalencia según un estudio del año 2000, se sitúa en el 13,7% (González *et al*, 2000). En la isla de Gran Canaria se han diagnosticado casos autóctonos, estando la prevalencia en aproximadamente un 2% (Sainz, 1998b). Estas prevalencias varían de las zonas rurales y

periurbanas a las urbanas, en general se encuentra una mayor prevalencia en áreas rurales debido a un mayor contacto de los animales con garrapatas (Sainz *et al*, 1995; Tesouro y Sainz, 2001)

Por otro lado, la mayor o menor exposición al vector también parece influir en la prevalencia de la enfermedad. Así, Sainz *et al* en 1995 encuentran una prevalencia de un 66.7% en una jauría de perros de caza con infestación masiva por garrapatas en la comunidad de Madrid, mientras que en una población de perros policía con un programa profiláctico intensivo que dificultaba la presencia de garrapatas encontraron un prevalencia de tan sólo un 2.29%.

Además de *E. canis*, en los últimos años se vienen detectando la presencia de mórulas intraplaquetarias compatibles con *E. platys* (hoy, *A. platys*) en sangre de perros de nuestro país. Por técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta y el Western-blot se ha confirmado la presencia de anticuerpos anti-*A. platys* en perros de España (Sainz *et al*, 1999b).

En relación con la posible patogenicidad de este agente en España, perros seropositivos a *A. platys* no tratados no han desarrollado signos de enfermedad compatible con ehrlichiosis (Sainz *et al*, 1999b). No obstante, recientemente se ha conseguido identificar y caracterizar genéticamente este agente en un perro con sintomatología clínica de ehrlichiosis (Aguirre *et al*, 2004a)

También parece ser frecuente la presencia conjunta de *E. canis* y *A. platys* en el mismo perro. De hecho, un estudio serológico realizado sobre un total de 47 sueros de perros con trombocitopenia residentes en España ha mostrado que 15 de ellos eran positivos sólo a *E. canis*, 6 sólo a *A. platys* y 10 a ambas especies, por lo que la presencia de *E. platys* en España parece ser más importante de lo que en principio se creía (Sainz *et al*, 1999b).

Además, se han detectado en sangre de perro anticuerpos frente a otras especies ehrlichiales como *E. ewingii*, *N. risticii* y *A. phagocytophilum* (Sainz *et al*, 1999a; Morales, 2000; Sainz *et al*, 2000b; Aguirre *et al*, 2003)

Por otro lado, se han observado concurrencia de ehrlichiosis con otras infecciones. La leishmaniosis canina es la patología que más frecuentemente se encuentra asociada a ehrlichiosis en nuestro país. Así, en perros diagnosticados de leishmaniosis y tratados específicamente frente a ella, cuando la respuesta terapéutica no es suficientemente buena y el proteinograma no termina de normalizarse, se debe descartar la presencia de ehrlichiosis (Sainz *et al*, 1999b). Tampoco es raro, debido a la coincidencia de vectores encontrar perros con ehrlichiosis y babesiosis y/o hepatozoonosis (Sainz *et al*, 1999b; Prieto, 2003)

En cuanto a la ehrlichiosis felina en España, diferentes estudios serológicos han mostrado la presencia en gatos de anticuerpos frente a diferentes especies de *Ehrlichia* (Tesouro *et al*, 1998; Aguirre *et al*, 2004b), si bien en ningún caso el análisis mediante PCR ha arrojado resultados positivos (Aguirre *et al*, 2004b).

En rumiantes, también se han descrito infecciones por *Anaplasma phagocytophilum*, concretamente en ovejas y vacas en el norte de España (Juste *et al*, 1989; Garcia-Pérez *et al*, 2003)

En cuanto a la posible existencia de ehrlichiosis humana en nuestro país, la información clínica se limita a la descripción de un caso de ehrlichiosis monocítica humana en Soria (Saz *et al*, 1994) y otro de ehrlichiosis granulocítica humana descrito en el Hospital de la Rioja en agosto de 1999 (Oteo *et al*, 2000; Oteo *et al*, 2001).

2.5. TRANSMISIÓN POR GARRAPATAS DE LAS EHRLICHIOSIS HUMANAS Y ANIMALES

Como ya ha sido señalado, la ehrlichiosis o enfermedad ehrlichial comprende las enfermedades producidas en animales superiores por agentes infecciosos pertenecientes a los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*. La transmisión de estos agentes se produce a través de agentes vectores, garrapatas en el caso de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y nematodos y trematodos en el caso de *Neorickettsia*.

Las garrapatas son parásitos externos pertenecientes taxonómicamente al suborden *Metastigmata*, orden *Parasitiformes*, subclase *Acari*, clase *Arachnida*, subphylum *Chelicerata*, phylum *Arthropoda*. Existen dos familias: *Ixodidae* o garrapatas duras y *Argasidae* o garrapatas blandas (Hoskins y Cupp, 1988; Cupp, 1991).

Las garrapatas son uno de los principales grupos de artrópodos que afectan la salud animal, ejerciendo una acción patógena directa, derivada de su efecto expoliatriz, mecánico y tóxico, (Murnaghan y O'Rourke, 1978; Quiroz, 1984) y una acción patógena indirecta, derivada de su capacidad de vehiculizar agentes patógenos (Hoogstraal, 1985).

Cuando las garrapatas vehiculizan agentes patógenos con potencial zoonótico, la salud humana también se encuentra involucrada (Hoogstraal, 1977). Se considera que las garrapatas están sólo por detrás de los mosquitos como vectores de enfermedades humanas en el mundo (Parola y Raoult, 2001). Uno de los principales grupos de agentes patógenos, de conocido potencial zoonótico, de los que las garrapatas son vectores son los agentes

ehrlichiales. Siendo las garrapatas de la familia *Ixodiade* las principalmente relacionadas con la transmisión de estas enfermedades (Kidd y Breitschwerdt, 2003).

Las garrapatas se encuentran distribuidas mundialmente aunque existe una distribución geográfica particular para cada una de las especies, a su vez cada especie de garrapata es vector de diferentes agentes patógenos. La existencia de las enfermedades transmitidas por garrapatas en un área geográfica está condicionada a la existencia de la garrapata vector. La identificación de las especies de garrapatas es un factor importante en la detección y diagnóstico de las enfermedades transmitidas por garrapatas y es un prerrequisito para su control y posible erradicación (Cupp, 1991).

Rhipicephalus sanguineus o garrapata marrón del perro se encuentra distribuida mundialmente, es vector entre otros agentes de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, por ello la ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial. Las garrapatas vectores de *Ehrlichia ruminantium* pertenecen a diversas especies de *Amblyoma* que sólo se encuentran en África, de ahí que la enfermedad del corazón de agua de los rumiantes se encuentre limitada a ese área geográfica (Bezuidenhout, 1987; Walker y Olwage, 1987; Camus y Barre, 1987; Deem, 1998). *Ehrlichia ewingii* y *E. chaffeensis* son transmitidas por *Amblyomma americana*, garrapata originaria del continente americano (Anziani *et al*, 1991; Murphy *et al*, 1998). *Ixodes ricinus* es la garrapata vector de *Anaplasma phagocytophilum* distribuida tanto en el continente americano como el europeo (Cupp, 1991).

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, cada uno de sus estadios evolutivos necesitan sangre como fuente nutritiva y en los adultos es necesaria para la producción de esperma y huevos (Cupp, 1991). Las garrapatas presentan cuatro estados evolutivos en su ciclo vital: huevo, larva hexápoda, ninfa octópoda y adulto, las dos últimas son las más importantes como vectores de enfermedad (Kidd y Breitschwerdt, 2003). La transformación entre un estado evolutivo y otro requiere de una o más mudas y puede necesitar de uno, dos o más huéspedes, esto tiene su importancia a la hora de su función como vector de enfermedades.

Las garrapatas inciden la piel del hospedador con el par de quelíceros y posteriormente insertan el hipostoma en la herida y lo hacen penetrar en la piel hasta llegar a los capilares sanguíneos que laceran produciendo un pequeño hematoma desde el que se alimentan (Cupp, 1991). El anclaje de la garrapata al hospedador depende de sus partes bucales, éstas son más o menos grandes dependiendo de la especie, en general las garrapatas con partes bucales más pequeñas producen una sustancia cementante que ancla estrechamente la garrapata al hospedador (Binnington y Kemp, 1980). Las garrapatas inyectan secreciones salivares que contienen sustancias que ayudan a penetrar en la piel del huésped además de alterar localmente la hemostasia y producir una reacción inflamatoria local que facilita la nutrición de la garrapata desde la lesión producida (Tatchell y Moorhouse, 1970; Balashov, 1972; Ribeiro *et al*, 1985; Ribeiro, 1987).

Algunas garrapatas pueden inocular componentes tóxicos como el responsable de la parálisis flácida (Gothe *et al*, 1979; Stone, 1988; Stone *et al*, 1989).

También es a través de la saliva como las garrapatas inoculan agentes patógenos al hospedador. La acción quimiotáctica de las secreciones salivares, atrae a la zona células inflamatorias factibles de ser infectadas por los patógenos inoculados (Berenberg *et al*, 1972), y puede producir una inmunosupresión local que facilitaría el establecimiento de los patógenos transmitidos en el hospedador (Kopecky *et al*, 1999).

La garrapata ingresa los patógenos en su organismo al alimentarse de un hospedador infectado, éstos 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 la comida (Tatchell, 1967; Tatchell, 1969; Sauer *et al*, 1986).

Existe una transmisión transtadial de los patógenos vehiculizados por las garrapatas, de tal manera que una infección adquirida en el estadio de ninfa se mantendrá hasta el adulto, pudiendo infectar a más de un huésped a lo largo de su desarrollo (Cupp,

1991). La transmisión transovárica, desde la garrapata hembra a su progeñe, no parece jugar un papel importante en la transmisión natural de las enfermedades ehrlichiales. Así, mientras Donatien y Lestoquard en 1937 indicaban la existencia de transmisión transestadial y transovárica de *E. canis* en *R. sanguineus*, estudios posteriores demuestran que la transmisión es exclusivamente transestadial (Groves *et al*, 1975; Smith *et al*, 1976).

Los géneros de garrapatas de la familia Ixodidae de mayor importancia médica, por su capacidad de transmisión de patógenos, son: *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Boophilus*, *Amblyoma* y *Haemaphysalis*.

El espectro de hospedadores suele ser amplio, no estando limitado a un hospedador específico, aunque suelen existir preferencias. Esta característica y la transmisión transestadial de patógenos, determinan la posibilidad de transmisión de la enfermedad entre distintas especies (Hoskins, 1991).

Las garrapatas son longevas y son capaces de mantenerse vivas, sin alimentarse, por periodos prolongados en cualquiera de sus estadios de desarrollo. En general el desarrollo de las garrapatas viene favorecido por climas cálidos, ya que no son capaces de soportar condiciones extremas de frío o humedad, sin embargo pueden buscar protección en casas, madrigueras, perreras, etc., pudiendo sobrevivir en climas fríos (Kidd y Breitschwerdt, 2003).

La longevidad de las garrapatas, su potencial reproductivo y la posible transmisión transovárica de algunos patógenos hace que las garrapatas no sólo puedan actuar como vectores de enfermedades, sino también como reservorios de patógenos. (Cupp, 1991).

La ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial acorde a la distribución de su vector: *Rhipicephalus sanguineus* (Cordero del Campillo, 1980; Hoskins, 1991). Esta garrapata es además capaz de vehiculizar otros agentes patógenos como: *Ehrlichia platys*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma phagocytophylum*, *Babesia canis* y *Haemobartonella canis*, por lo que no es raro encontrar más de una enfermedad asociada

en el mismo animal (Hoskins y Cupp, 1988; Woody y Hoskins, 1991; Simpson *et al*, 1991; Breitschwerdt, 2002).

Rhipicephalus sanguineus es también capaz de producir enfermedad paralizante en perros.

En el perro las garrapatas adultas se encuentran fundamentalmente en las orejas, a lo largo de la nuca y en los espacios interdigitales. Las larvas y ninfas se suelen encontrar en las áreas de pelo largo del cuello y en infecciones masivas se pueden encontrar todos los estadios evolutivos en la mayoría de las regiones corporales (Hoskins, 1991).

Rhipicephalus sanguineus es una garrapata de tres hospedadores, en zonas tropicales y subtropicales, la garrapata se puede encontrar durante todo el año. En climas mediterráneos su actividad se inicia en primavera perdurando hasta el otoño. En invierno no se encuentran sobre los animales y en clima frío no son capaces de sobrevivir, sin embargo pueden encontrar refugio en casas, pajares, perreras, lo que les permite su supervivencia (Cupp, 1991).

Los adultos de *R. sanguineus* son capaces de sobrevivir sin alimentarse hasta 568 días y pueden transmitir *E. canis* hasta 155 días tras haberla ingerido (Lewis *et al*, 1977), lo que nos muestra su gran potencial, aunque no exista transmisión transovárica del patógeno, tanto como vector tanto como reservorio (Woody y Hoskins, 1991). Por ello, el control de las poblaciones de garrapatas sobre el animal y el medio ambiente es fundamental en la lucha y prevención de las enfermedades ehrlichiales (Keefe *et al*, 1982, Garris, 1991).

En España se encuentran las siguientes especies de garrapatas: *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus* (Estrada, 2003a; Estrada, 2003b).

Dermacentor reticulatus predomina en las zonas húmedas y frescas del norte peninsular, mientras que *Rhipicephalus sanguineus* prefiere un ambiente más cálido que encuentra en el resto del territorio español (Estrada-Peña, 2003a). En las zonas Mediterráneas y del interior las infestaciones por garrapatas (*R. sanguineus*) tienen un ciclo de actividad primaveral y estival. Mientras que existe una amplia franja que abarca toda la cornisa Cantábrica, Galicia, Navarra y parte del norte de Castilla en que se aprecia un incremento de las infestaciones por garrapatas en periodo invernal (*D. reticulatus*).

Poblaciones de *Ixodes ricinus* se encuentran en el norte de España, manifestando una actividad uni o bimodal en distintas áreas según las condiciones ambientales. Esta garrapata prefiere áreas de elevación media con veranos templados y con lluvia de moderada a elevada a lo largo del año, por lo que su principal área geográfica es el norte de España, estando ampliamente distribuida en el País Vasco (Moreno y Estrada-Peña, 1997; Estrada-Peña, 2001)

2.6. INMUNOPATOGENIA

El cuadro clínico y las lesiones generadas en el curso de la ehrlichiosis son consecuencia directa tanto de la propia infección bacteriana, como de la respuesta inmune desencadenada por el hospedador. La excesiva producción de anticuerpos en presencia de una respuesta celular disminuida tiene un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad (Burghen *et al*, 1971; Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al*, 1999).

Con el fin de facilitar la comprensión de la patogenia de la enfermedad, claramente definida por la respuesta inmune inducida en el organismo hospedador, realizaremos una breve descripción de cada uno de los mecanismos del sistema inmune de los animales superiores y su influencia en la resistencia frente a la infección por organismos ehrlichiales.

Todo organismo animal está provisto de mecanismos defensivos frente a las agresiones por patógenos externos y el sistema inmune es el encargado de su puesta en marcha.

Aunque, todos los mecanismos inmunológicos están estrechamente relacionados se puede hablar de dos tipos de inmunidad: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

La inmunidad innata se corresponde con aquellos mecanismos desencadenados de manera intrínseca una vez que el agente patógeno entra en contacto con el organismo. Se trata de mecanismos inespecíficos que no requieren la identificación del patógeno. Si el agente patógeno no es destruido por estos mecanismos, se desarrollan otros más sofisticados y específicos para la destrucción del agente. Estos últimos constituyen la

llamada inmunidad adquirida que necesita de un contacto previo con el patógeno para su puesta en marcha (Roitt, 1998a).

2.6.1. INMUNIDAD INNATA

Los mecanismos defensivos desarrollados por la inmunidad innata son: la fagocitosis, el sistema del complemento, las células natural killer (NK) y las citoquinas.

A continuación se revisarán diferentes aspectos de la importancia de estos mecanismos en la infección por *Ehrlichia spp.*

La **fagocitosis** consiste en la ingestión y destrucción de agentes patógenos o de células infectadas o degeneradas y la realizan células especializadas que forman parte del llamado sistema fagocitario. El sistema fagocitario está formado por los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y por las células del sistema mononuclear fagocitario (SMF). Las células del SMF derivan de los promielocitos de la médula ósea que tras su diferenciación en monocitos sanguíneos se asientan en los tejidos como macrófagos maduros. (Roitt, 1998a)

Para activarse el mecanismo de la fagocitosis, es necesario que el patógeno entre en contacto con la célula y se adhiera a su superficie. Para ello existen proteínas de superficie que actúan como receptores celulares para los ligandos bacterianos de *Ehrlichia spp.* (Messick y Rikihisa, 1993).

Uno de los receptores de adherencia más importante es el complemento receptor tipo III (CR3: CD11b/CD18) que promueve, entre otros mecanismos, la fagocitosis y la combustión respiratoria (Dib, 2000). Tanto el Interferon-gamma (IFN- γ), como la integrina β 2: CD11b/CD18 median la activación celular y parece ser que juegan un papel fundamental en la eliminación de la infección al limitar la replicación ehrlichial (Borjesson *et al.*, 2002).

La adhesión bacteriana produce una activación de la membrana celular y se inicia la fagocitosis con la formación de un fagosoma en el que se internaliza el agente bacteriano. Los lisosomas celulares, vacuolas celulares en cuyo interior se encuentran una gran variedad de enzimas y moléculas antimicrobianas preformadas, se fusionan al fagosoma y se produce la digestión del patógeno (Roitt, 1998a).

La destrucción de la célula fagocitaria provocaría la liberación de agentes bacterianos, enzimas lisosómicas y metabolitos tóxicos capaces de producir una destrucción tisular crónica con inflamación.

Las *Ehrlichias* son bacterias cocoides, Gram negativas, de vida intracelular obligada con tropismo, según la especie implicada, por monocitos/macrófagos o granulocitos, pero no por ambas células a la vez (Rikihisa, 1991a). Las bacterias intracelulares obligadas, como *Ehrlichia spp.*, necesitan para sobrevivir, ser internalizadas por células; por ello, no sólo han desarrollado mecanismos defensivos que eviten su destrucción en el interior de las células sino también, y de manera paradójica, mecanismos que estimulan el proceso de fagocitosis. Estas bacterias son capaces de replicarse en el interior de fagosomas del citoplasma de las células infectadas (Rikihisa 1991a).

Las *Ehrlichias* pierden su capacidad infectiva a las horas de hacerse extracelulares (Park and Rikihisa 1991); es por ello que, al contrario que otros patógenos, estas bacterias desarrollan propiedades que les facilitan la penetración al interior de las células, favoreciendo la fagocitosis. La patogenia de la enfermedad está relacionada con la habilidad del organismo de replicarse en el interior de los macrófagos (Park y Rikihisa, 1991). Una vez favorecida la fagocitosis, el siguiente objetivo de la ehrlichia, para sobrevivir y multiplicarse, es evitar la fusión de los lisosomas al fagosoma de inclusión (Wells y Rikihisa, 1988; Petrovec, 1997; Gokce y Woldehiwet, 1999). Si el hospedador es capaz de inhibir la actividad metabólica ehrlichial, se producirá la fusión de los lisosomas con la membrana de inclusión ehrlichial (Messick y Rikihisa, 1994) y la destrucción de la bacteria. El tratamiento con oxitetraciclinas se basa en este efecto, es decir, en destruir a la bacteria al favorecer esta fusión (Wells y Rikihisa 1988).

La infección por *Ehrlichia spp.* se produce tras la picadura del hospedador por una garrapata hematófaga. La propia picadura provoca inflamación y liberación de mediadores químicos que, a su vez, producen una quimiotaxis positiva de células inflamatorias. Este efecto inflamatorio favorece la infección por *Ehrlichia spp.*, ya que cuanto mayor sea el número de granulocitos o monocitos/macrófagos en el punto de inoculación, mayor probabilidad de infectar estas células (Theis y Budwiser, 1997; Rikihisa, 1991).

Tras un periodo de incubación que, según diversos estudios, puede variar de ocho a veinte días (Ewing y Buckner, 1965; Hibler *et al.*, 1986), se produce la diseminación de los agentes ehrlichiales por la circulación sanguínea y linfática (Huxsoll *et al.*, 1970; Buhles *et al.*, 1974). El potencial patogénico del organismo se ve favorecido por la movilidad de los macrófagos que pueden diseminar la infección por todo el organismo.

Las inclusiones ehrlichiales intracitoplasmáticas se suelen observar en sangre durante 2 semanas, aunque en algunos animales se pueden ver hasta 52 días post-infección (Whist *et al.*, 2002). Debido a que las ehrlichias son cocos muy pequeños y además son muy pocos los organismos fagocitados por cada macrófago (Park y Rikihisa, 1991), el número de células infectadas que presentan inclusiones ehrlichiales, al microscopio óptico, es menor de un 10% (Bakken *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha comprobado *in vitro* que, a las 3 horas de la infección, prácticamente el 100% de los macrófagos son positivos a antígenos de *Ehrlichia risticii* en su citoplasma. En 48 horas los antígenos desaparecían en un 50-70% de las células, volviendo a aparecer nuevamente en el 100% de las células a los 4-6 días postinfección (Messick y Rikihisa, 1993)

A la vista de los resultados, los autores plantearon tres hipótesis:

- 1) Se desarrollan ehrlichias viables, no viables y restos ehrlichiales. Todo ello es fagocitado, si bien sólo las ehrlichias viables evitan la fusión fagosoma-lisosoma y entran en multiplicación; el resto de antígenos ehrlichiales son digeridos por las enzimas lisosomales y desaparecen.

2) Las ehrlichias, como las clamidias (Moulder, 1991), presentan formas infectivas y replicativas; ambas formas son fagocitadas, pero sólo una es capaz de sobrevivir y replicarse en los macrófagos.

3) Las células son inicialmente capaces de matar las ehrlichias viables, pero luego son agotadas por la infección.

Finalmente los autores consideraron como más probable la primera hipótesis.

La elaboración de **radicales libres de oxígeno y de nitrógeno** es otro de los mecanismos a través del cual los macrófagos o células fagocitarias son capaces de destruir agentes infecciosos. Los patógenos intracelulares desarrollan mecanismos para contrarrestar los efectos de estos radicales, posibilitando su supervivencia en los macrófagos.

Se ha demostrado experimentalmente que *N. risticii* puede penetrar en los macrófagos sin estimular una combustión respiratoria (Williams *et al*, 1994); sin embargo, en caso de exposición previa al agente sí se estimula este proceso de combustión (Williams *et al*, 1994). De este modo, la producción de una respuesta específica puede eliminar la infección por *N. risticii* siendo este fenómeno mediado por los radicales libres de oxígeno producidos por los macrófagos (Williams *et al*, 1994).

Otros estudios demuestran que la infección con *A. phagocytophilum* produce una disminución de la combustión respiratoria que perdura aproximadamente 3 semanas (Batungbacal, 1995; Banerjee *et al*, 2000; Whist *et al*, 2002).

La combustión oxidativa necesita para su función la activación de la integrina $\beta 2$ (CD11b/CD18), relacionada con la destrucción intracelular y la eliminación de la infección (Berton *et al*, 1996; Dib, 2000). En infecciones experimentales, la falta de células CD11b/CD18 permite la replicación de las ehrlichias (Borjesson *et al*, 2002), lo que sugiere la importancia de este mecanismo en la patogenia de la enfermedad.

Este bloqueo de la unión de fagosoma–lisosoma como de la combustión respiratoria, que tiene lugar en el curso de la ehrlichiosis, se produce tan sólo frente a *Ehrlichias spp.*, es decir, estos mecanismos funcionan correctamente frente a otros agentes que pudieran estar infectando simultáneamente al mismo animal (Lilliehöök *et al*, 1999).

El **sistema del complemento** participa en la inmunidad innata favoreciendo que las células fagocitarias se aproximen a las bacterias. El complemento es un sistema complejo que media la respuesta innata a través de una cascada de reacciones enzimáticas cuyo fin último es la lesión de la membrana celular externa y la lisis de la célula diana. Son escasos los estudios al respecto, si bien parece ser que el sistema del complemento no es fundamental en la resistencia frente a infecciones por *Ehrlichia spp.* (Feng y Walker, 2004)

Las **células natural Killer (NK)** son linfocitos granulares grandes (LGG) que reconocen glucoproteínas de alto peso molecular presentes en la superficie de células infectadas y ejercen su acción defensiva induciendo la apoptosis de la célula diana. Se trata de una acción citotóxica producida de manera innata. Las células NK son linfocitos no T, no B que también intervienen en la inmunidad adquirida de tipo celular (McDonough y Moore, 2000). Producen IFN- γ que participa en la activación de los macrófagos (Park y Rikihisa, 1992) y las células NK presentes en hígado también contribuyen a respuestas antivirales, tumorocidas e inflamatorias patogénicas (Wiltrot, 2000).

Todas las células implicadas en el proceso infeccioso son capaces de secretar sustancias que intervienen activamente en los procesos inmunes. Estas sustancias se denominan **citoquinas** y son importantes mediadores de la activación leucocitaria y de la quimiotaxis en numerosas condiciones infecciosas e inflamatorias, compartiendo la habilidad de activar y de dirigir la migración de los diferentes tipos de leucocitos (Charley y Blecha, 1991; Roitt, 1998a).

El Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) combinado con el IFN- γ , producido por los linfocitos T y las células NK, son indispensables en la protección frente a infecciones ehrlichiales (Akkonyulu y Fikrig, 2000; Feng y Walker, 2004).

En casos de ehrlichiosis crónica, la presencia de *Ehrlichia spp.* en los macrófagos puede modular la respuesta inflamatoria a través de citoquinas que potencialmente causarían efectos perjudiciales al hospedador, habiéndose sugerido que mucha de la sintomatología de la ehrlichiosis es más bien debida a la perturbación de los macrófagos que a los efectos directos de *Ehrlichia spp.* (Rikihisa *et al* 1985).

Las citoquinas pueden tener un importante papel patogénico en la infección por *Ehrlichia spp.* (Klein *et al*, 2000). Se ha demostrado que las células infectadas por el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana, producen citoquinas que actúan como potentes inhibidores de la proliferación de células madre de la médula ósea y pueden contribuir a las citopenias observadas en el curso de la infección (Broxmeyer *et al*, 1990; Adams y Lloyd, 1997; Klein *et al*, 2000).

Además, las ehrlichias son capaces de reducir la producción de citoquinas de tipo inflamatorio (interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y TNF- α) y de aumentar la producción de citoquinas de tipo supresor: (Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1 α), Monocyte Chemotactic Protein (MCP-1) e Interleuquina 8 (IL-8)) (Mansueto *et al*, 1997; Klein *et al*, 2000).

2.6.2. INMUNIDAD ADQUIRIDA

Hemos descrito anteriormente cómo *Ehrlichia spp.* sobrevive en el interior de las células fagocitarias al alterar los mecanismos destructores innatos de estas células. Sin embargo, las células fagocitarias son capaces de procesar pequeños fragmentos antigénicos y colocarlos en la superficie de la célula hospedadora (Charley y Blecha, 1991). Esto permite su interacción con células encargadas de la inmunidad adquirida, que representan la inmunidad específica frente a *Ehrlichia spp.*

Existen dos tipos de inmunidad adquirida: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

2.6.2.1 Inmunidad humoral

La inmunidad humoral está mediada por linfocitos B, llamados así porque se diferencian en la médula ósea (en inglés, bone marrow) (Roitt, 1998a). Estos linfocitos elaboran unas moléculas tetrapeptídicas formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras denominadas anticuerpos. De manera básica podríamos representar a los anticuerpos como una estructura espacial de tres brazos, en forma de Y. Cada uno de estos brazos actúan como regiones principales, dos de ellas capaces de comunicarse con el sistema del complemento y los fagocitos (funciones biológicas) y otra capaz de reconocer y fijarse a un microorganismo individual (función de reconocimiento externo). Cada anticuerpo es específico para un antígeno, necesitando una porción de reconocimiento especial, mientras que las regiones de función biológica pueden mantenerse constantes (Roitt, 1998b).

Cada linfocito B está programado para elaborar un único tipo de anticuerpo, que coloca en su superficie externa para que actúe como receptor. Cuando un antígeno penetra en el organismo, se unirá a aquellos receptores (anticuerpos) en los que encaje bien. Los linfocitos B, cuyos receptores han fijado antígeno, reciben una señal y se convierten en células plasmáticas, capaces de producir numerosos anticuerpos idénticos a aquel que portaban en su superficie. A su vez, los linfocitos B sufren un proceso de expansión clonal, multiplicándose en elevado número para elaborar anticuerpos específicos para ese antígeno en suficiente cantidad (Roitt, 1998b).

Los anticuerpos pueden inactivar antígenos extracelulares o recubrir patógenos bacterianos marcándolos para su posterior destrucción por células del tipo NK. La vida intracelular de las bacterias es un mecanismo protector frente a los anticuerpos, que carecen de poder de penetración al interior de las células. (Pérez *et al*, 1996). Por ello la respuesta inmune de tipo celular es el mecanismo defensivo por excelencia, aunque no exclusivo, frente a bacterias intracelulares obligadas, como *Ehrlichia spp.* (Roitt, 1998a).

Tradicionalmente no se ha considerado que los anticuerpos jueguen un papel importante en la defensa frente a la infección por *Ehrlichia spp.* Sin embargo, se ha

observado que pueden ejercer una acción protectora al inicio de la infección (Kaylor *et al*, 1991).

Los anticuerpos podrían intervenir en la protección frente a infecciones ehrlichiales a tres niveles:

- Facilitando la citolisis de organismos ehrlichiales por las vías clásicas de deposición del complemento y/o opsonización (Messick y Rikihisa, 1994; Byrom *et al*, 1993),
- previniendo la unión e internalización en la célula hospedadora (Messick y Rikihisa, 1994; Byrom *et al*, 1993)
- mediando la citolisis de los macrófagos infectados (Winslow *et al*, 2000).

Una vez que la infección se ha establecido en los tejidos, los anticuerpos ejercen su acción (Kaylor *et al*, 1991). Esta respuesta de anticuerpos, independiente de los linfocitos T, produce un control de la enfermedad en los primeros estadios de infección, antes del desarrollo de una respuesta celular completa (Winslow *et al*, 2000). En cualquier caso es necesaria la acción de la inmunidad celular para producir la resolución completa de la infección, hecho que los anticuerpos por sí solos no son capaces de producir. La respuesta humoral desencadenada en el curso de la infección por *Ehrlichia spp.* se mantiene a lo largo de toda la infección e incluso mucho tiempo después del tratamiento (Reardon y Pierce, 1981; Bartsch y Greene, 1996; Harrus *et al*, 1999). Esta exagerada respuesta humoral, lejos de resolver la infección, produce graves complicaciones en el organismo (Burghen *et al*, 1971; Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al*, 1999).

La dinámica de la producción de anticuerpos en la infección por *Ehrlichia spp.* ha sido ampliamente estudiada. Se han detectado anticuerpos específicos antiehrlichia a partir de los 7 días postinfección (Weisiger *et al*, 1975; Waner *et al*, 1996), aunque en la mayoría de los casos no se desarrollan hasta la segunda o tercera semana postinfección. Estas diferencias pueden estar en función de la dosis infectiva (Rikihisa *et al*, 1992). La cota máxima de anticuerpos se alcanza al mes de la fase de ehrlichemia, persistiendo durante

largos periodos de tiempo títulos elevados en el curso de la infección (Bartsch y Greene, 1996; Burghen *et al*, 1971; Harrus *et al*, 1997).

La existencia de cantidades elevadas de anticuerpos circulantes predispone a la aparición de inmunocomplejos circulantes que pueden causar graves lesiones en el organismo tales como glomerulonefritis, poliartritis y uveitis, especialmente durante la fase crónica (Codner y Maslin, 1992; Ristic y Holland, 1993; Harrus *et al* en 2001).

Esta intensa respuesta humoral desencadenada durante la ehrlichiosis es muy amplia y no sólo se restringe a la producción de anticuerpos antiehrlichiales (Reardon y Pierce, 1981). Así, se han observado anticuerpos plaquetarios (Waner *et al*, 1995; Harrus *et al*, 1996; Waner *et al*, 2000a) y antieritrocitarios (Ristic y Holland, 1993; Frank y Breitschwerdt, 1999) en el curso de esta enfermedad. Por el contrario, no se ha detectado la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) (Harrus *et al*, 2001), siendo estos anticuerpos más frecuentes en cuadros de autoinmunidad primaria idiopática que en el curso de autoinmunidad secundaria a una infección crónica.

Muchos patógenos bacterianos y protozoarios transmitidos por vectores son capaces de evitar la respuesta inmune del hospedador mediante la producción de variaciones antigénicas de sus proteínas de superficie (Deitsch *et al*, 1997). Una de las causas de la intensa respuesta humoral generada por las distintas especies ehrlichiales podría ser esta capacidad de recombinación génica, que permitiría al agente causal variar los epitopos superficiales inmunogénicos para evitar las defensas del hospedador e inducir la producción de numerosos anticuerpos y la persistencia de la infección (Reddy *et al*, 1998; Brown *et al*, 2003).

2.6.2.2. Inmunidad celular

Las células T, las citoquinas solubles y las células NK son los principales responsables de la protección frente a las infecciones por patógenos intracelulares. La respuesta inmunomediada de tipo celular juega un papel decisivo en la infección por

Ehrlichia spp., tanto en la recuperación de los animales de la infección como en la resistencia a la reinfección (Nyindo *et al* 1980; Rikihisa, 1991; Ristic *et al* 1993; Williams *et al*, 1994).

La denominación de linfocitos T deriva del lugar donde maduran: el parénquima tímico. Los linfocitos T están especializados en la destrucción de células infectadas por microorganismos intracelulares. Para su activación necesitan contactar con el antígeno que portan las células presentadoras de antígeno (monocitos y macrófagos) en su superficie. Para ello tiene un receptor antígeno-específico (TCR) como parte integrante de su membrana celular. El TCR se encuentra íntimamente vinculado a un complejo de péptidos transmembranosos denominado CD3. Una vez que el receptor TCR se liga al antígeno, el CD3 es el encargado de activar a la célula. El CD3 sólo se encuentra presente en los linfocitos T y es la molécula empleada para su identificación (Roitt, 1998b).

Para reconocer el antígeno, los linfocitos T necesitan que éste sea presentado en la superficie de una célula acompañado de un marcador de superficie celular que informa al linfocito T de estar haciendo contacto con dicha célula. Estos marcadores celulares pertenecen a un importante grupo de moléculas conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (McDevitt, 2000). Existen dos tipos principales de CMH: el CMH de clase I y el de clase II.

El CMH de clase I está presente prácticamente en todas las células nucleadas del organismo e interviene en el reconocimiento de los antígenos por parte de los llamados linfocitos T citotóxicos ó Tc (linfocitos CD3+,CD8+) (Jondal *et al*, 1996).

Las moléculas del CMH de tipo II se encuentran en los linfocitos B y en las células presentadoras de antígeno (APC), que son los macrófagos o células del SMF. Las células endoteliales y las células epiteliales cuando son inducidas por el IFN- γ también pueden actuar como células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T cooperadores ó Th (linfocitos CD3+, CD4+) son activados al reconocer el antígeno en la superficie de las APC, asociado al CMH de tipo II (Williams, 1997).

Los agentes ehrlichiales son capaces de afectar al procesado y presentación de antígenos por las APC, en un intento de perpetuar la infección y evitar la respuesta inmune de tipo celular (Messick y Rikihisa, 1992).

El TCR se encuentra unido a la membrana celular por dos cadenas necesarias para la especificidad antigénica. Existen dos tipos de TCR atendiendo al tipo de cadenas que lo componen: TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ (Caldwell *et al*, 1995; De Rosa *et al*, 2004). La cantidad de linfocitos de uno u otro tipo varía con la especie animal. Mientras que en rumiantes los linfocitos T $\gamma\delta$ representan del 30 al 80 % de los linfocitos T sanguíneos (Hein y MacKay, 1991; Hayday, 2000), en humanos y en cánidos estas células son minoritarias, representando tan sólo de un 0,5 a un 15 % de las células T en sangre de perros sanos (Roitt, 1998a; McDonough y Moore, 2000). En nódulos linfáticos, bazo y timo este tipo de linfocitos también son escasos, siendo, en general, más predominantes en epitelio intestinal y en piel (Goodman y Lefrancoi, 1988; Bucy *et al*, 1988; Hein y Mackay, 1991; Deush *et al*, 1991, Roitt, 1998a). Otros autores han constatado la existencia de linfocitos T $\gamma\delta$ esplénicos en proporciones elevadas, hallándose en zonas de circulación celular y no en las áreas convencionales de presencia de linfocitos T (McDonough y Moore, 2000).

Los linfocitos T $\gamma\delta$ parecen ejercer una función citotóxica frente a células tumorales y células autólogas infectadas por patógenos intracelulares (Caldwell *et al*, 1995). Sin embargo existen todavía muchas incógnitas en cuanto a su función y a los mecanismos por los que reconocen antígenos (Hayday, 2000; De Rosa, 2004)

Otras importantes moléculas de superficie de los linfocitos T son las moléculas CD4 y CD8. La mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ son linfocitos que carecen de ambas moléculas, es decir son linfocitos T CD4 y CD8 negativos. Mientras que dentro de los linfocitos T $\alpha\beta$ podemos diferenciar:

- Los linfocitos T citotóxicos ó Tc que expresan en su superficie el antígeno CD8 y reconocen antígenos exógenos asociados a moléculas de histocompatibilidad de tipo I (Jondal *et al*, 1996).
- Los linfocitos T cooperadores ó Th (en ingles, *helper*) que presentan el antígeno CD4 en su superficie y reconocen los antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (Williams, 1997).

Los linfocitos Tc ($CD3^+ CD8^+$) contribuyen a la resistencia frente a infecciones intracelulares por virus, protozoos y patógenos bacterianos a través de diferentes mecanismos (Harty *et al*, 2000). Así, los linfocitos Tc secretan perforinas que crean poros en la membrana basal de las células diana y transfieren enzimas almacenadas en gránulos citoplasmáticos (granzimas) que inducen la apoptosis de las células diana (Smyth y Trapini, 1995). Estos linfocitos también participan en los mecanismos inmunitarios con la producción de citoquinas como $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ (Harty *et al*, 2000). También pueden actuar como potentes células desencadenantes de una respuesta memoria tras la infección, según se ha podido constatar en modelos humanos y murinos de leishmaniosis (Müller *et al*, 1993; Müller *et al*, 1994; Mendonca *et al* 1995).

Los linfocitos Th ($CD3^+ CD4^+$), dependiendo de las citoquinas que elaboran, son capaces, bien de inducir una respuesta de tipo humoral estimulando la producción de anticuerpos por las células B, o bien de inducir una respuesta de tipo celular activando macrófagos y células citotóxicas para la destrucción de los patógenos intracelulares. Los linfocitos T cooperadores en base a la producción de estas citoquinas se subclasifican en Th1 y Th2:

- Los linfocitos Th1 producen interleuquina 2 (IL2) e interferon- γ ($IFN-\gamma$) entre otras citoquinas e inducen una respuesta inmune de tipo celular, importante en la eliminación de patógenos intracelulares. (Akkonyunlu y Fikrig, 2000).

- Los linfocitos Th2 producen interleuquina 4 (IL4) e interleuquina 5 (IL5) entre otras citoquinas e inducen una respuesta inmune de tipo humoral, más orientada a la lucha frente a patógenos extracelulares (Roitt, 1998a).

Las poblaciones de linfocitos T y B son poblaciones independientemente reguladas, de modo que la ausencia de una de estas poblaciones no se compensa por el aumento de la otra. Algo similar ocurre entre las poblaciones de linfocitos T de tipo $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Sin embargo, dentro de los linfocitos T $\alpha\beta$ las poblaciones $CD4^+$ y $CD8^+$ son correguladas, es decir, una disminución en el número de una de ellas suele producir un incremento en el número de las otras de tal manera que el número total de células $\alpha\beta$ se mantiene relativamente constante (Rocha *et al*, 1989; Freitas y Rocha, 2000).

Morfológicamente, se ha observado la presencia de linfocitos grandes granulares (LGL), cuya cantidad aumenta considerablemente en ciertos procesos patológicos, fundamentalmente relacionados con neoplasias y estímulos antigénicos crónicos. El análisis inmunofenotípico de estos linfocitos divide a éstos en dos líneas:

- 1) Linfocitos granulares grandes $CD3^-$, que no expresan el receptor de células T (TCR), estarían representados por las células NK (McDonough y Moore, 2000).
- 2) Linfocitos granulares grandes $CD3^+$, que expresan el receptor de células T (TCR) y representan células T citotóxicas activadas (Loughran *et al*, 1988; Scott y Richards, 1992). Suelen ser $CD4^-$, pero pueden ser $CD8^+$ ó $CD8^-$ (Wellman *et al*, 1989). Los linfocitos granulares grandes $CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^-$ suelen ser linfocitos T de tipo $\gamma\delta$.

Aunque existe poca información sobre los linfocitos granulares grandes en perros normales, se estima que esta población puede comprender del 0 al 10% de la población de linfocitos circulantes (McDonough y Moore, 2000).

Poco se ha estudiado sobre la respuesta inmune de tipo celular en casos de ehrlichiosis canina y de otras especies. Parte de este hecho se ha debido a la dificultad en obtener anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos para linfocitos caninos (Byrne *et al*, 2000). Actualmente el desarrollo de MAbs específicos para la diferenciación de antígenos leucocitarios en perros ha ayudado enormemente al estudio de la respuesta celular así como al análisis detallado y a la clasificación histopatológica de las enfermedades linfoproliferativas (Dumler *et al*, 2000).

Aunque existe poco conocimiento de la inmunopatogenia de la ehrlichiosis en cuanto a la respuesta celular, se ha observado que individuos infectados por *Ehrlichia* pueden ser capaces de superar la infección tras la fase aguda de la enfermedad, ya que una respuesta inmune adecuada, de tipo celular, llevaría a una recuperación espontánea y a la disminución o incluso a la negativización del título de anticuerpos (Madigan *et al*, 1990; Artursson *et al* 1999). Sin embargo, sin tratamiento y si la respuesta inmune no es la adecuada, la infección se suele mantener latente estableciéndose un estado de portador prolongado (Reddy *et al*, 1998).

Uno de los mecanismos por los que no se activa una respuesta celular efectiva puede ser la capacidad de las ehrlichias de producir variaciones antigénicas en epitopos superficiales que dificultarían su reconocimiento por los linfocitos T (Brown *et al*, 2003).

En el curso de la infección experimental se ha observado que la respuesta inmune de tipo celular disminuye con el tiempo y desaparece sobre el día 147 post-inoculación, mientras que el título de anticuerpos humorales aumenta con el tiempo y se mantiene en una elevada concentración (Nyindo *et al*, 1980). Por el contrario, la recuperación del animal frente a la infección se ha asociado a la existencia de linfocitosis T (Everett *et al*, 1994, Caldwell *et al*, 1995). La falta de respuesta inmune adecuada conduce a la cronicidad de la infección y ésta, al agotamiento del organismo, provocando la aparición de un cuadro clínico y lesional tan grave que puede conducir a la muerte del individuo. En estos casos los títulos de anticuerpos específicos anti-*Ehrlichia* se mantienen elevados a lo

largo de toda la enfermedad, por lo que se intentó establecer, sin éxito, una medida de la respuesta celular en base a su correlación con el título de anticuerpos (Nyindo *et al*, 1980).

En el curso de la infecciones ehrlichiales se ha observado la presencia de leucopenia con neutropenia y linfopenia en los primeros días de la infección experimental, retornando los recuentos a la normalidad hacia el día 13-16 post-infección (Woldehiwet, 1991). La linfopenia se caracterizaba por una disminución en el número de linfocitos B y T y un aumento en el número de células NK (Woldehiwet, 1991).

Otro estudio reafirma la importancia de la respuesta celular como protección frente a la ehrlichiosis, al observar una infección más grave en Pastores Alemanes que en Beagles, relacionada con la respuesta celular disminuida característica de los primeros (Nyindo *et al*, 1980).

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T, en el curso de la ehrlichiosis se ha observado una inversión del índice linfocitario CD4/CD8, debido a un incremento de los linfocitos T CD8⁺ y una disminución de los linfocitos CD4⁺ (Woldehiwet, 1991; Heeb *et al*, 2003). La inversión del índice CD4/CD8 sugiere una inmunoincompetencia que puede predisponer a los animales infectados a padecer otras enfermedades y, a su vez, otras enfermedades pueden hacerlos susceptibles al desarrollo de la fase crónica de la enfermedad (Woldehiwet y Scott, 1982b; Woldehiwet, 1991; Larsen *et al*, 1994; Frank y Breitschwerdt, 1999; Gokce y Woldehiwet, 1999).

En el mismo sentido, recientemente se ha demostrado la importancia de linfocitos T CD4 y CD8 en la protección frente a la infección por *Ehrlichia muris* en ratones. Concretamente los linfocitos T citotóxicos son fundamentales en la protección inmune frente a *Ehrlichia spp.* (Feng y Walker, 2004). Estudios anteriores ya habían sugerido un probable aumento de la citotoxicidad mediada por células consecutiva a un incremento en linfocitos Tc y NK en el curso de las infecciones ehrlichiales (Weiser *et al*, 1991). La contribución de los linfocitos T cooperadores en la inmunidad frente a esta infección es fundamentalmente a través de la secreción de IFN- γ , unido a su papel en el desarrollo de la

inmunidad humoral y en la proliferación de linfocitos T citotóxicos (Feng y Walker, 2004). El IFN- γ produce la activación de los macrófagos y su consecuente producción de moléculas tóxicas como el NO (Park y Rikihisa, 1992; Akkoyunlu y Fikrig, 2000; Banerjee *et al*, 2000) para la eliminación de los patógenos intracelulares.

En dos casos de ehrlichiosis canina, se ha encontrado la existencia de linfocitos T dobles positivos CD4⁺ CD8⁺, hasta representar un 18% de las células T (Heeb *et al*, 2003). La función de estos linfocitos T CD4⁺ CD8⁺ dobles positivos no se conoce, pero pueden representar una proliferación clonal secundaria a inflamaciones crónicas como es el caso de la ehrlichiosis (Heeb *et al*, 2003).

Se ha observado una base celular en la patogenia de la trombocitopenia dependiente de linfocitos T, que a su vez ejercen una acción citotóxica sobre monocitos autólogos infectados por ehrlichias, aunque el mecanismo exacto debe ser determinado (Kakoma *et al*, 1977).

Los linfocitos granulares grandes parecen participar también en la inmunopatogenia de la ehrlichiosis (Weiser *et al*, 1991; Heeb *et al*, 2003), ya que se ha descrito la posible aparición de linfocitosis granular de tipo $\gamma\delta$ prolongada en el curso de la ehrlichiosis canina crónica (McDonough y Moore, 2000). La proliferación de linfocitos grandes granulares de tipo $\gamma\delta$, población normalmente minoritaria, se observa también en personas tratadas de ehrlichiosis (Caldwell *et al*, 1995).

En perros además de en ehrlichiosis, la linfocitosis granular se ha descrito en procesos neoplásicos como la leucemia linfocítica crónica y la leucemia linfoblástica aguda (Weiser *et al*, 1991; Heeb *et al*, 2003).

La mayoría de los linfocitos granulares grandes circulantes en el hombre son CD3⁻ (Richards y Scott, 1992), es decir, células NK. Sin embargo, la mayoría de los casos de linfocitosis granular en humanos se debe a la proliferación de linfocitos T CD3⁺, con una

escasa proporción de células NK (Pandolfi *et al*, 1992). Esta misma observación se ha detectado en perros afectados de linfocitosis granular (McDonough y Moore, 2000).

Para finalizar este capítulo, pasamos a realizar una breve descripción de la patogenia de la enfermedad en relación a las tres fases de la misma (aguda, subclínica y crónica).

Tras la entrada y replicación de *E. canis* en el interior de las células del SMF, se produce su diseminación por el organismo vía sanguínea y linfática. Esto coincide con la **fase aguda** de la enfermedad, que suele durar de 2 a 4 semanas (Huxsoll *et al*, 1970; Buhles *et al*, 1974).

La infección por *Ehrlichia spp.* produce una hiperplasia del sistema linforreticular que se manifiesta a nivel de los órganos linfoides, por una activación de los centros germinales con incremento de la población blástica. Esta transformación se observa tanto a nivel del bazo como de los nódulos linfáticos, produciéndose una disminución de población linfocitaria madura y un aumento de la población linfoblástica. Esta actividad hiperplásica afecta tanto a los linfocitos T como a los B durante la fase aguda de la infección (Reardon y Pierce, 1981).

La hiperplasia linforreticular conduce a una esplenomegalia que favorece el secuestro de plaquetas y eritrocitos, lo que contribuye a la presentación de anemia y a la trombocitopenia observada. Además, el bazo como gran productor de anticuerpos contribuye a la patogenia y gravedad de la enfermedad a través de la inefectiva sobreproducción de anticuerpos y como fuente de macrófagos (Harrus *et al*, 1997; Harrus *et al*, 1999).

Se ha observado que, en la ehrlichiosis granulocítica, *Ehrlichia* infecta predominantemente células precursoras mieloides en órganos hematopoyéticos que podrían representar el foco primario de infección desde el cual los neutrófilos maduros infectados emergen a la sangre (Klein *et al*, 1997; Bunnell *et al*, 1999). Tanto las células progenitoras de líneas monocíticas como granulocíticas en la médula ósea son susceptibles de ser

infectadas (Klein, 1997). Sin embargo, menos de un 10% de las células maduras circulantes se ven infectadas en el curso de la infección (Bakken *et al*, 1996). Algunos autores sugieren que la infección se propagaría por liberación de células de la médula ósea infectadas (Bunnell *et al*, 1999). Se especula la posibilidad de un secuestro duradero de los agentes infecciosos en órganos como médula ósea, bazo o pulmón (Bunnell *et al*, 1999).

En los primeros estadios de las infecciones ehrlichiales se observa un incremento en la actividad de la médula ósea (Buhles *et al*, 1975; Reardon y Pierce, 1981) aunque esto no repercute en un incremento en la producción de células sanguíneas maduras (Reardon y Pierce, 1981).

El sistema linforreticular en su conjunto tiene un papel multifactorial en la infección aguda por *E. canis* y las lesiones histológicas que afectan a las células del sistema hemático y linforreticular reflejan una reacción exagerada del hospedador en un intento de compensar una respuesta inmune ineficaz (Reardon y Pierce, 1981; De Castro *et al*, 2004). En este sentido, se ha observado un incremento del número de linfocitos tanto en nódulos linfáticos como en bazo en esta fase aguda. Concretamente, en nódulos linfáticos esta población está integrada por un gran número de linfocitos CD8⁺ que pueden inducir un daño tisular por la eliminación a través de citólisis de las células infectadas, contribuyendo así a la patogenia de la enfermedad (De Castro *et al*, 2004).

Tras la fase aguda de la ehrlichiosis, los animales pasan a un estado subclínico que puede establecerse durante años y en el que, en ausencia de sintomatología clínica, el agente permanece en órganos como bazo y médula ósea. La **fase subclínica** de la enfermedad aparece a las 6-9 semanas de la infección y puede durar de 1 mes a 5 años (Buhles *et al*, 1974; Codner *et al*, 1986). Esta fase se caracteriza por ausencia de sintomatología con o sin presencia de alteraciones hematológicas (como anemia, trombocitopenia y leucopenia) y por títulos elevados de anticuerpos humorales (Greene y Harvey, 1984; Codner *et al*, 1986). Durante esta fase pueden ocurrir tres supuestos:

1. los animales se recuperan espontáneamente (Greene y Harvey, 1984; Hibler *et al*, 1986; Madigan *et al*, 1990; Artursson *et al* 1999),

2. son tratados y eliminan la infección (Greene y Harvey, 1984; Hibler *et al*, 1986; Madigan *et al*, 1990; Artursson *et al* 1999) o
3. pasan a la fase crónica de la enfermedad (Buhles *et al*, 1974; Greene y Harvey, 1984; Reddy *et al*, 1998).

Se debe dar gran importancia a la identificación de los individuos en fase subclínica de la infección, con el fin de evitar que la enfermedad progrese hacia la fase crónica (Harrus *et al*, 1998b; Harrus *et al*, 1999).

Las condiciones por las que se desarrolla la **fase crónica** de la infección son desconocidas y pueden estar relacionadas con la raza, el estado inmunitario del individuo, condiciones de estrés, coinfección con otros parásitos o reinfecciones persistentes (Harrus *et al*, 1997; Breitschwerdt *et al*, 1998b). Factores individuales del paciente asociados con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad clínica, probablemente relacionados con su sistema inmune, deben ser determinados todavía (Wong y Thomas, 1998).

En cuanto a la patogenia de la fase crónica de la enfermedad, poco se sabe (Harrus *et al*, 1999). La existencia de una disrregulación previa del sistema inmune, bien por autoinmunidad o por infección con otros agentes, predispone a los pacientes al desarrollo de enfermedad clínica en el curso de la infección por *Ehrlichia spp.* (Wong y Thomas, 1998).

Parece ser que situaciones de estrés o de inmunosupresión son capaces de desencadenar un cuadro clínico tras una prolongada fase subclínica (Codner y Farris-Smith, 1986). Sin embargo, en el curso de infecciones experimentales y durante la fase aguda de la enfermedad, un estado de inmunosupresión ni previene ni modifica significativamente las manifestaciones clínicas de la ehrlichiosis (Reardon y Pierce, 1981).

La participación de mecanismos inmunomediados en la patogenia de la enfermedad es, si cabe, más acusado en la fase crónica de la misma (Harrus *et al*, 1999). La gravedad de la fase crónica se ha asociado a la trombocitopenia y al grado de aplasia medular

(Hildebrant *et al*, 1973; Buhles *et al*, 1974; Codner y Farris-Smith, 1986). La hipoplasia de médula ósea observada en fases crónicas puede ser el resultado de la infección persistente que promueve el fallo o supresión de las células madre pluripotenciales y puede estar inmunológicamente mediada (Huxsoll, 1990), habiéndose observado infiltrados plasmocitarios en la médula ósea (Frank y Breitschwerdt, 1999).

También se propone la existencia de un factor esplénico supresor de la hematopoyesis cuya producción se encuentra inducida por la infección por *Ehrlichia spp*. Es posible que este factor juegue un papel en la supresión de la médula ósea que aparece en la fase crónica de la enfermedad (Harrus *et al*, 1997).

Durante esta fase crónica se observa también infiltración extensiva de los órganos parenquimatosos por células plasmáticas y acúmulos perivasculares de estas células en pulmones, riñones, bazo, meninges y ojos, principalmente (Reardon y Pierce, 1981). Se ha asociado a la enfermedad el desarrollo de glomerulonefritis y nefropatía con pérdida de proteínas en la fase crónica de la enfermedad por depósitos de inmunocomplejos circulantes (Frank y Breitschwerdt, 1999).

La infiltración por células plasmáticas de las meninges está relacionada con la aparición de signos neurológicos asociados a la ehrlichiosis crónica (Woody y Hoskins, 1991, Frank y Breitschwerdt, 1999).

En resumen, aunque no del todo conocida, está bien documentada la existencia de una respuesta inmune aberrante en el curso de la ehrlichiosis (Burghen *et al*, 1971; Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al*, 1999), la cual influye enormemente en la patogenia de la enfermedad. De hecho, como acabamos de exponer, un gran número de alteraciones, lesiones y signos clínicos se pueden explicar desde un punto de vista inmunológico. (Hildebrandt *et al*, 1973; Woody y Hoskins, 1991; Ristic y Holland, 1993; Waner *et al*, 1995; Harrus *et al*, 1999).

2.7. CUADRO CLÍNICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

La sintomatología asociada a la ehrlichiosis canina es muy inespecífica, habiéndose llegado a identificar más de 50 signos clínicos diferentes asociados a esta patología (Sainz, 1996).

Se distinguen tres fases en esta enfermedad tanto a nivel del cuadro clínico como de la patogenia, si bien clínicamente no siempre es sencillo conocer la fase de la enfermedad. Este hecho se debe a que, aunque para cada una de estas fases se describe un cuadro clínico con predominio de una sintomatología concreta, una gran variedad de signos clínicos pueden aparecer tanto en la fase aguda como en la crónica (Huxoll *et al*, 1970; Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991). La fase subclínica es probablemente la más sencilla de identificar puesto que se caracteriza por la ausencia de sintomatología, apareciendo únicamente alteraciones biopatológicas (Woody y Hoskins, 1991; Sainz *et al*, 1996).

Una vez que se ha producido la entrada de *Ehrlichia spp.* en el organismo, el periodo de incubación de la enfermedad viene a durar de 9 a 14 días, tras los cuales comienzan a aparecer las primeras manifestaciones de la enfermedad que se corresponden en el tiempo con la fase aguda de la enfermedad. Ésta suele durar de 4 a 7 semanas. La presencia de garrapatas debería observarse en esta fase; sin embargo, no es un signo constante y sólo se ha constatado en un 40% de los animales afectados (Troy *et al* 1980; Greene *et al*, 1985). Por supuesto el contacto con garrapatas es imprescindible para el desarrollo de la enfermedad, por lo que en zonas endémicas realizar una buena anamnesis

demandando información sobre el contacto con los vectores es fundamental (Woody y Hoskins, 1991; Breitschwerdt, 2003).

Tras la fase aguda se presenta la fase subclínica, caracterizada por la ausencia de sintomatología. Su duración en infecciones naturales puede ser de hasta 5 años (Codner y Farris-Smith, 1986). Durante la misma el animal puede superar la enfermedad (Greene y Harvey, 1984; Hibler *et al*, 1986) o progresar en un momento dado hacia la fase crónica (Buhles *et al* 1974; Greene y Harvey, 1984), que puede conducirle a la muerte (Bhules *et al*, 1974).

La virulencia de la cepa de *E. canis*, la duración del proceso, el grado de respuesta del perro afectado, su edad y raza son factores que determinan la evolución de la enfermedad, así como la presentación de un mayor o menor número de manifestaciones clínicas (Nyindo *et al*, 1980; Greene y Harvey, 1984).

El cuadro clínico más frecuente (en el 75% de los casos) es la aparición de sintomatología general inespecífica (Sainz *et al*, 1996). Entre los signos generales se puede detectar fiebre, apatía, decaimiento, anorexia o apetito caprichoso, pérdida de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia (Huxsoll *et al* 1970; Troy *et al*, 1980; Greene y Harvey, 1984; Kuehn y Gaunt, 1985; Greene *et al*, 1985; Breitschwerdt *et al*, 1987; Waddle y Littman, 1988; Sainz *et al*, 1996). También puede aparecer edema de extremidades o de escroto (Huxsoll *et al*, 1970; Woody y Hoskins, 1991; Breitschwerdt, 1995).

Estas son las manifestaciones clínicas más frecuentes en la fase aguda, aunque también suelen aparecer con bastante frecuencia en las formas leves de la fase crónica (Troy *et al*, 1980; Hibler *et al*, 1986).

Las manifestaciones respiratorias, oculares y cutáneas son las siguientes en frecuencia de presentación, apareciendo en un 35- 40% de los casos (Sainz, 1996). Estos signos suelen ser más habituales en la fase crónica, aunque también se han descrito en la fase aguda (Huxsoll *et al*, 1970; Codner *et al*, 1985; Gelatt, 1991).

El cuadro respiratorio se caracteriza por la presentación de exudado mucopurulento acompañado en ocasiones de disnea y tos (Huxsoll *et al*, 1970; Codner *et al*, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985; Sainz, 1996). La disnea puede también ser debida a la existencia de anemia severa (Sainz, 1996).

Los signos oftalmológicos suelen ser más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad, habiéndose descrito uveitis anterior, fotofobia, conjuntivitis, opacidad corneal e hipema. Más raramente se puede presentar retinitis difusa, desprendimiento de retina, hemorragia subretiniana y neuritis óptica (Troy *et al*, 1980; Hoskins *et al*, 1983, Troy y Forrester, 1990). Se ha descrito también la aparición de ceguera aguda en casos de ehrlichiosis monocítica canina (Harrus *et al*, 1998d; Gould *et al*, 2000). Estos cuadros oftalmológicos graves parecen estar asociados a la hiperviscosidad sanguínea secundaria a la gammapatía monoclonal presente en algunos casos de ehrlichiosis (Harrus *et al*, 1998c).

Si bien la única sintomatología cutánea relacionada con la ehrlichiosis hasta hace poco tiempo era la aparición de equimosis y petequias (Troy *et al*, 1980; Waddle y Littman, 1988; Perille y Matus, 1991), Sainz en 1996 describe una incidencia relativamente elevada de problemas cutáneos asociados a la ehrlichiosis, que pueden variar desde la mala calidad del pelo hasta la aparición de dermatitis alopecias con eritema y descamación que remiten tras el tratamiento; lesiones semejantes han sido descritas por otros autores (Price *et al*, 1987; Sagredo *et al*, 1994)

La frecuencia de presentación de hemorragias se estima en un 35% (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988; Sainz *et al*, 1996), si bien algunos estudios refieren incidencias más altas (Troy *et al*, 1980) y otros, más bajas (Price *et al*, 1987). El signo hemorrágico más frecuente (en el 70% de los casos con hemorragias) es la epistaxis (Price *et al*, 1987; Troy y Forrester, 1990; Sainz *et al*, 1996). Otros signos hemorrágicos que pueden aparecer son petequias, equimosis, hematoquecia, hematuria o hemorragia subconjuntival. También ha sido descrita la aparición de hematomas tras la extracción sanguínea o la inyección de fármacos (Troy *et al*, 1980).

Otros síntomas que se pueden presentar, con menor frecuencia y especialmente en fase crónica, son de tipo neurológico, digestivo, locomotor, urinario y reproductor.

A nivel neurológico se ha observado la aparición de episodios de ataxia, síndromes de neurona motora superior e inferior, hiperestesia generalizada, polineuropatía periférica, e incluso convulsiones (Troy *et al*, 1980; Greene et Harvey, 1984; Hibler *et al*, 1986; Marezki *et al*, 1994; Meinkoth *et al*, 1998; Sainz, 1996; Hernández *et al*, 2003)

En cuanto al sistema locomotor se ha descrito la aparición de cojeras intermitentes debidas a poliartritis (Bellah *et al*, 1986; Cowell *et al*, 1988) y polimiositis (Buoro *et al*, 1990).

Los signos digestivos suelen ser infrecuentes, limitándose a la aparición de hematemesis y de sangre en heces en animales con tendencias hemorrágicas (Hildebrant *et al*, 1973; Woody y Hoskins, 1991), aunque más recientemente se han descrito procesos diarreicos de intestino grueso (Sainz, 1996).

En fases crónicas se puede desarrollar una glomerulopatía inmunomediada que produce una insuficiencia renal la cual no suele responder al tratamiento. En estos casos la sintomatología asociada es la clásica de una insuficiencia renal crónica: poliuria, polidipsia, anorexia, vómitos o úlceras orales (Troy *et al*, 1980; Codner y Maslin, 1992).

La patología a nivel reproductor es muy poco frecuente, habiéndose descrito hemorragias petequiales en mucosa genital y edema de escroto. En hembras se ha asociado con ehrlichiosis la presencia de sangrado prolongado durante el proestro y el post-parto, infertilidad, abortos y muerte neonatal (Woody y Hoskins, 1991; García-Pérez *et al*, 2003).

Tal y como se acaba de referir, la sintomatología de esta enfermedad es muy variada e incluso recientemente se ha descrito un caso de trombosis de la aorta y de la vena porta en un perro con ehrlichiosis (Bressler *et al*, 2003).

2.8. ALTERACIONES LABORATORIALES EN EL CURSO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

A continuación vamos a analizar las principales alteraciones laboratoriales observadas en la ehrlichiosis.

2.8.1 ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS

La **trombocitopenia** es casi un factor constante en la infección por *Ehrlichia*, apareciendo a los 15-20 días post-infección y pudiendo persistir durante todas las fases de la enfermedad (Troy *et al*, 1980; Greene *et al*, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt *et al*, 1987; Waddle y Littman, 1988; Davoust *et al*, 1991a; Harrus *et al*, 1997). Sin embargo, se han descrito casos de ehrlichiosis sin trombocitopenias (Woody y Hoskins, 1991; Frank y Breitschwerdt, 1999). La patogenia de la trombocitopenia es compleja y multifactorial, participando mecanismos inmunológicos y no inmunológicos que producen una disminución de la producción y un aumento de la destrucción de plaquetas (Weisiger *et al*, 1975; Harrus *et al*, 1996b; Grindem *et al*, 1999)

Uno de los mecanismos inmunológicos que intervienen en la trombocitopenia por ehrlichiosis es la producción de anticuerpos antiplaquetarios. Estos anticuerpos se han encontrado en elevadas cantidades tanto en perros tras la infección experimental o natural, (Harrus *et al*, 1996b; Buhles *et al*, 1974; Lewis *et al*, 1975; Waner *et al*, 1995; Grindem *et al*, 1999; Waner *et al*, 2000a) como en personas afectadas por ehrlichiosis (Wong y Thomas, 1998). En el perro estos anticuerpos se encuentran en unos niveles elevados a partir del séptimo día post-infección, luego comienzan a disminuir hacia el día 29,

desapareciendo en el día 75 (Grindem *et al*, 1999). Para otros autores la trombocitopenia llega a su máxima expresión sobre el día 30 y posteriormente comienza a recuperarse (Reardon y Pierce, 1981). La trombocitopenia en la fase aguda de la infección podría ser debida fundamentalmente a una destrucción plaquetaria inducida por la presencia de estos anticuerpos. Se han sugerido diversos mecanismos por los que los anticuerpos antiplaquetarios participan en la génesis de la trombocitopenia: favorecen el secuestro de plaquetas recubiertas de anticuerpos por el bazo y otros tejidos linfoides; favorecen la destrucción plaquetaria prematura por fijación del complemento o fagocitosis; inducen disfunción plaquetaria que conduce al sangrado, aún con la presencia de un número normal de plaquetas; afectan el ritmo de producción plaquetaria (Kakoma *et al*, 1977; Harrus *et al*, 1996b; Frank y Breitschwerdt, 1999; Grindem *et al*, 1999).

Además, se han descrito otros mecanismos que intervienen en la patogenia de la trombocitopenia como la existencia de un factor supresor de la migración plaquetaria sintetizado por los linfocitos B (Abeygunawardena, 1988; Ristic y Holland, 1993).

De todo ello se deduce que en la fase aguda de la infección, la trombocitopenia es generada por una disminución de la vida media plaquetaria más que por un descenso en la producción de plaquetas (Reardon y Pierce, 1981). En esta fase llega incluso a observarse un incremento de la trombopoyesis (Waner *et al*, 1995), mientras que, en la fase crónica de la enfermedad, la principal causa de trombocitopenia sería la hipoplasia de médula ósea (Woody y Hoskins, 1991).

La fase aguda de la ehrlichiosis puede cursar con **anemia** producida por la destrucción acelerada de eritrocitos por mecanismos inmunológicos (Buhles *et al*, 1974; Reardon y Pierce, 1981). En esta fase la anemia normalmente es regenerativa (Woody y Hoskins, 1991) ya que la médula ósea suele ser hipercelular (Buhles *et al*, 1975). Un elevado número de perros con anemia regenerativa serán positivos al test de Coombs, lo cual debe ser tenido en cuenta para no incurrir en errores diagnósticos (Greene *et al*, 1985). Durante la fase subclínica, el recuento de eritrocitos generalmente se normaliza (Buhles *et al*, 1974), aunque se pueden encontrar casos con ausencia de sintomatología clínica y

presencia de alteraciones hematológicas (Codner y Farris-Smith, 1986). En la fase crónica, la anemia será no regenerativa debido a la destrucción continuada de eritrocitos, la pérdida crónica de sangre y la existencia de hipoplasia o aplasia medular (Hildebrant *et al*, 1973; Buhles *et al*, 1974; Woody y Hoskins, 1991; Makinde y Bobade, 1994).

El recuento de leucocitos en sangre es variable, encontrando inicialmente una ligera **leucopenia** (Buhles *et al*, 1974; Reardon y Pierce, 1981) debida al secuestro de leucocitos motivado por procesos inmunológicos e inflamatorios (Ristic, 1976). Esta leucopenia puede transformarse posteriormente en leucocitosis (Hibler *et al*, 1986). Se ha descrito una inversión de la formula leucocitaria en perros con ehrlichiosis, con presentación de una neutropenia y una linfocitosis relativa (Sainz, 1996), también se ha reseñado la existencia de linfocitosis granular (Weiser *et al*, 1991; Heeb *et al*, 2003)

Estas citopenias (anemia, leucopenia, trombocitopenia) son mucho más graves en la fase crónica y se suelen asociar a una hipoplasia medular; habiéndose observado incluso la aparición de aplasia medular completa con cuadro severo de pancitopenia que desemboca en la muerte del perro (Hildebrant *et al*, 1973; Buhles *et al*, 1974; Waddle y Littman, 1988; Makinde y Bobade, 1994). Otros procesos inmunológicos, además de la producción de citoquinas participan en estas citopenias de fase crónica. No obstante, en la fase crónica de la enfermedad suele observarse una plasmocitosis debida al estímulo antigénico crónico (Hildebrandt *et al*, 1973; Weisiger *et al*, 1975; Kuehn y Gaunt, 1985).

La leucopenia observada en el curso de la ehrlichiosis, motivada por una depleción del número de neutrófilos, se puede presentar con un aumento de células inmaduras que carecen de capacidad fagocitaria y de combustión respiratoria óptima lo que incrementa la susceptibilidad de estos pacientes a otras infecciones (Taylor *et al*, 1941; Woldehiwet, 1987; Whist *et al*, 2002; Whist *et al*, 2003).

La función de los leucocitos también puede verse alterada, así, los linfocitos de perros con ehrlichiosis pueden producir un factor con efecto citotóxico sobre monocitos autólogos (Kakoma *et al*, 1977).

2.8.2. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS

Hiperproteinemia con hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia son las alteraciones bioquímicas predominantes en perros infectados por *E. canis* (Weisiger *et al*, 1975; Harrus *et al*, 1996a).

La exacerbada producción de anticuerpos presente en ehrlichiosis canina se traduce en la existencia de **hiperproteinemia**, (Burghen *et al*, 1971; Troy *et al*, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Weiser *et al*, 1991), caracterizada por una **hipergammaglobulinemia** principalmente policlonal (Burghen *et al*, 1971; Buhles *et al*, 1974; Ristic y Holland, 1993). No obstante, también se ha observado hipergammaglobulinemia monoclonal (Hoskins *et al*, 1983; Breitschwerdt *et al*, 1987). La concentración de gamma-globulinas aumenta durante la fase febril de la ehrlichiosis canina y persiste durante las fases subclínica y crónica de la enfermedad (Ristic y Holland, 1993). Los niveles de hipergammaglobulinemia y de actividad de anticuerpos específicos no guardan correlación, indicando que la mayoría de las globulinas responsables de la elevación de las gammaglobulinas no son anticuerpos frente *E. canis* (Reardon y Pierce, 1981).

La hipergammaglobulinemia monoclonal produce un aumento de la viscosidad de la sangre que puede exacerbar la tendencia hemorrágica de la enfermedad y tener consecuencias oftalmológicas como hemorragias intraoculares, desprendimiento de retina e incluso ceguera aguda (Harrus *et al*, 1998b; Martin, 1999; Gould *et al*, 2000)

La **hipoalbuminemia** comienza a presentarse hacia el día 14 y se recupera a partir del día 35 sin llegar a los valores normales iniciales (Reardon y Pierce, 1981). La hipoalbuminemia, que se observa en la primera fase de la infección, puede ser consecuencia tanto de la pérdida periférica de albúmina a fluidos edematosos por el incremento de permeabilidad vascular, pérdida de sangre o disminución de la producción de proteína debida a una enfermedad hepática concurrente (Reardon y Pierce, 1981). La hipoalbuminemia también podría mantenerse como mecanismo compensatorio de la hiperglobulinemia, para así contrarrestar un incremento de la presión oncótica y prevenir el

aumento de viscosidad de la sangre (Woody y Hoskins, 1991). En fases más crónicas, la glomerulopatía y la vasculitis podrían ser las causas de la hipoalbuminemia (Woody y Hoskins, 1991; Codner y Maslin, 1992).

Aunque en perros con ehrlichiosis se suelen encontrar valores normales de los parámetros laboratoriales indicadores tanto de la funcionalidad **hepática** como de la **renal** (Greene, 1995), se han descrito aumentos de la ALT y de la fosfatasa alcalina, fundamentalmente en fase aguda, que pueden también acompañarse de hiperbilirrubinemia (Troy y Forrester, 1990). Estos valores suelen disminuir hasta niveles fisiológicos con la instauración de una terapia apropiada, excepto en aquellos animales en los que, como consecuencia de la ehrlichiosis, se ha producido una lesión hepática o renal irreversible (Woody y Hoskins, 1991)

Los aumentos en la urea y la creatinina por encima de los valores fisiológicos de referencia pueden tener un origen prerrenal (deshidratación) o renal, habiéndose observado casos de uremia asociados a glomerulonefritis y a plasmocitosis intersticial renal (Troy *et al*, 1980; Breitschwerdt *et al*, 1987).

La **proteinuria** y la **hematuria**, con o sin uremia, se han detectado en infecciones experimentales durante la fase aguda de ehrlichiosis. La pérdida máxima de proteínas se detecta a las 3-4 semanas post-infección y es debida a una nefropatía motivada por la existencia de lesiones ultraestructurales a nivel glomerular (Codner y Maslin, 1992). Esta proteinuria desaparece durante la fase subclínica, al igual que ocurre con la hipoalbuminemia. En fases crónicas la aparición de proteinuria y hematuria, con o sin uremia (Troy *et al*, 1980), está relacionada con la existencia de lesiones gromerulares inmunomediadas (Troy y Forrester, 1990; Breitschwerdt, 1995). También se ha detectado proteinuria en perros con gammapatía monoclonal; en estos casos, el perfil electroforético de las proteínas de la orina presenta un paralelismo con las séricas, apareciendo un claro aumento de las IgG (Breitschwerdt *et al*, 1987).

En caso de aparición de problemas hemorrágicos, se suelen observar **tiempos de hemorragia** y de retracción del coágulo prolongados debido a la existencia de trombocitopenia o trombocitopatía (Kuehn y Gaunt, 1985; Hibler *et al*, 1986). El tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activada y los productos de degradación del fibrinógeno suelen ser normales (Kuehn y Gaunt, 1985), excepto en el caso de que se haya instaurado un cuadro de coagulación intravascular diseminada (Hibler *et al*, 1986).

El análisis del **líquido cefalorraquídeo** de perros con sintomatología neurológica muestra elevados niveles de proteínas y pleocitosis mononuclear con gran número de linfocitos y células plasmáticas (Greene *et al*, 1985)

En casos con artritis, el **líquido sinovial** suele presentar una coloración amarillenta con aumento de la concentración de proteínas y del recuento celular, con predominancia de neutrófilos maduros (75%) y con algunos macrófagos y linfocitos.

2.9. DIAGNÓSTICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

En cualquier proceso patológico para llegar al diagnóstico es necesario previamente presuponer la compatibilidad del proceso con el diagnóstico (Scott *et al*, 2001). Un mismo cuadro clínico puede ser compatible con varias enfermedades y una misma enfermedad puede tener presentaciones clínicas diversas; por ello, habitualmente se realiza una primera aproximación a los posibles diagnósticos diferenciales en base a las características clínicas del proceso y posteriormente se confirman o descartan estos diagnósticos con pruebas laboratoriales.

En el capítulo de diagnóstico de la ehrlichiosis canina, hay que tener en cuenta, por un lado, las características clínicas y laboratoriales compatibles con ehrlichiosis y, por otro lado, aquellas pruebas que determinan directa o indirectamente la presencia del agente patógeno en el animal.

2.9.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

Tal y como se ha abordado previamente, el cuadro clínico de la ehrlichiosis canina es totalmente inespecífico: depresión, letargia, pérdida de peso, anorexia, fiebre, linfadenomegalia (Huxsoll *et al* 1970; Greene y Harvey, 1984; Breitschwerdt *et al*, 1987; Waddle y Littman, 1988; Troy *et al*, 1980; Khuen y Gaunt, 1985; Greene *et al*, 1985; Sainz, 1996). Estos signos clínicos pueden aparecer en numerosas enfermedades y no siempre aparecen conjuntamente en el curso de la ehrlichiosis canina. Por otro lado, el cuadro clínico de la ehrlichiosis también varía en función del animal y de la fase de la enfermedad.

La aparición de cuadros hemorrágicos como epistaxis, petequias en piel o mucosas, melena, hematuria, hipema o hemartrosis hacen más probable la inclusión de la ehrlichiosis en un listado de diagnósticos diferenciales; sin embargo, esta sintomatología hemorrágica se presenta en menos de la mitad de los perros con ehrlichiosis (Troy y Forrester, 1990).

La detección de garrapatas en la exploración o el conocimiento de una infestación previa en un animal enfermo, o incluso sano, es suficiente para sugerir una probable infección por *Ehrlichia* spp, en especial, en áreas con una alta tasa de prevalencia (Keefe *et al*, 1982; Garris, 1991; Woody y Hoskins, 1991).

Así pues, el cuadro clínico puede sugerir la presencia de ehrlichiosis, si bien no existen signos patognomónicos de la enfermedad. En cualquier caso, el análisis de la sintomatología clínica es fundamental para, en su caso, poner en marcha las pruebas encaminadas al diagnóstico de esta enfermedad.

2.9.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Debido a la gran variedad de signos clínicos con los que cursa la ehrlichiosis, el diagnóstico diferencial debe incluir numerosas patologías. Sin embargo, la leishmaniosis, en áreas geográficas como la nuestra, es la enfermedad con la que más frecuentemente se puede confundir, debido a la similitud de muchos de sus signos: hemorragias, apatía, pérdida de peso, linfadenopatía, uveítis, hiperproteinemia con hiperglobulinemia, artritis, etc. (Sainz, 1996).

También se debe diferenciar de otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la babesiosis o la hepatozoonosis.

Otra patología con sintomatología y alteraciones en la analítica sanguínea similares es el lupus eritematoso sistémico (Kelly *et al*, 1994a). En ehrlichiosis, a pesar de la gran cantidad de autoanticuerpos producidos no se han encontrado anticuerpos antinucleares, característicos del lupus eritematoso sistémico (Harrus *et al*, 2001).

La presencia de linfocitosis granular o la afectación de la médula ósea podría confundirla con procesos neoplásicos como el mieloma, la leucemia linfoblástica aguda o la leucemia linfocítica crónica (Weiser *et al*, 1991; Heeb *et al*, 2003).

2.9.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.9.3.1 Pruebas laboratoriales inespecíficas

Los resultados de pruebas como la hematología y la bioquímica sanguínea pueden ayudar al diagnóstico de ehrlichiosis canina. Entre los hallazgos que nos pueden hacer sospechar de la presencia de esta enfermedad se encuentra la **trombocitopenia**. Es éste el hallazgo más frecuente en perros con ehrlichiosis canina, apareciendo a los 15-20 días postinfección y pudiendo perdurar durante todas las fases de la enfermedad (Troy *et al*, 1980; Greene *et al*, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt *et al*, 1987; Waddle y Littman, 1988; Davoust *et al*, 1991a). El recuento plaquetario no siempre se correlaciona con la presencia y gravedad de cuadros hemorrágicos (Troy *et al*, 1980), pudiéndose encontrar trombocitopenia en ausencia de hemorragia y hemorragias en ausencia de trombocitopenia (Kuehn y Gaunt, 1985; Codner *et al*, 1985; Woody y Hoskins, 1991; Perille y Matus, 1991)

La **hiperproteïnemia** debida a una **hiperglobulinemia** es un hallazgo también frecuente en el curso de la ehrlichiosis canina, debido al estímulo antigénico crónico (Burghen *et al*, 1971; Buhles *et al*, 1974; Weisiger *et al*, 1975; Troy *et al*, 1980; Codner *et al*, 1985; Greene *et al*, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt *et al*, 1987; Davoust *et al*, 1991b; Weiser *et al*, 1991).

El aumento de las globulinas no está tan relacionado con la cantidad de anticuerpos producidos frente a *E. canis* como con la duración de la enfermedad y la producción de autoanticuerpos (Burghen *et al*, 1971; Ristic *et al*, 1972; Weisiger *et al*, 1975; Reardon y Pierce, 1981).

La hiperglobulinemia suele corresponder a una gammapatía policlonal, como se puede apreciar por electroforesis (Kuehn y Gaunt, 1985; Ghorbel *et al*, 1993b). Ocasionalmente se puede detectar gammapatía monoclonal por aumento de inmunoglobulina G (Hoskins *et al*, 1983; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt *et al*, 1987; Matus *et al*, 1987).

Acompañando a la hiperglobulinemia se suele encontrar una **hipoalbuminemia**, producida por diferentes causas como el agotamiento de la albúmina en el proceso inflamatorio y el catabolismo proteico asociado a la enfermedad (Burghen *et al*, 1971; Hibler *et al*, 1986; Woody y Hoskins, 1991; Davoust *et al*, 1993). Además, se ha observado una relación inversamente proporcional entre la cantidad de proteína perdida en orina y la concentración sérica de albúmina, por lo que la presencia de proteinuria es un indicador importante de la disminución de la albúmina (Codner y Maslin, 1992).

También pueden encontrarse en el curso de la ehrlichiosis canina otras alteraciones laboratoriales, menos frecuentes, como anemia, leucopenia, elevación de la fosfatasa alcalina o de la alanina transaminasa (Waddle *et al*, 1988; Troy *et al*, 1980; Frank y Breitschwerdt, 1999).

2.9.3.2. Pruebas laboratoriales específicas

2.9.3.2.1 Examen microscópico del agente etiológico

La **observación de mórulas** o inclusiones intracelulares compatibles con *E. canis* en el interior de monocitos y/o linfocitos de sangre circulante es diagnóstico de la infección (Elias, 1991; Mylonakis *et al*, 2003). Sin embargo, es difícil la observación de estas formas debido a su pequeño tamaño y a que el total de células mononucleares infectadas suele ser inferior al 1%; este porcentaje se va reduciendo a medida que evoluciona la enfermedad (French y Harvey, 1983; Cowell *et al*, 1988). La probabilidad de encontrar las formas intracelulares aumenta durante la fase de infección aguda, especialmente en perros leucopénicos, si previamente se realiza una leucoconcentración de la muestra sanguínea y se realiza una extensión de la capa de glóbulos blancos (Ewing, 1969; Hibler *et al*, 1986;

Beaufils y Legroux, 1992) o si se realiza una fina extensión de sangre periférica obtenida del pabellón auricular (Ewing, 1969; Greene y Harvey, 1984; Hibler *et al*, 1986).

También se han observado estas mórulas en leucocitos procedentes de líquido cefalorraquídeo, líquido articular y de lavado prostático (Bellah *et al*, 1986; Cowell *et al*, 1988; Marezki *et al*, 1994; Meinkoth *et al*, 1998).

La observación de las mórulas, si bien indica infección, no identifica el tipo de agente ehrlichial responsable de la misma.

Las mórulas también pueden detectarse a partir de **cultivos celulares** a partir de sangre de perros infectados. Sin embargo, esta técnica no tiene utilidad clínica puesto que pueden pasar hasta 8 semanas en obtenerse cultivos positivos. Además, son costosos económicamente, sólo suelen estar disponibles en laboratorios especializados y no siempre se consigue el aislamiento; en todo caso, los cultivos son una importante herramienta de investigación (Neer *et al*, 2002).

2.9.3.2 Diagnóstico serológico

Las técnicas serológicas son las pruebas diagnósticas más utilizadas ante una infección ehrlichial. Estas técnicas no detectan el organismo causal, sino anticuerpos producidos frente a éste.

Los títulos elevados de anticuerpos se pueden observar tras la exposición al agente, durante la fase aguda, subclínica y crónica de la infección e incluso después de un tratamiento efectivo. Por ello es importante entender que un diagnóstico serológico positivo puede indicar infección activa, o simplemente exposición al agente, y que la interpretación de los resultados de estas pruebas siempre debe realizarse en el contexto del caso clínico y no de forma aislada (Cohn, 2003).

En fases iniciales de la infección aguda y en animales moribundos se pueden encontrar títulos negativos, en los primeros por no haber dado tiempo a la producción de una respuesta humoral y en los segundos por agotamiento de la producción de anticuerpos (Weisiger *et al*, 1975; Waner *et al*, 2001; Cohn, 2003).

En el suero se detectan anticuerpos anti Ehrlichia del tipo inmunoglobulina G entre los 7 y los 28 días post-infección (Ristic *et al*, 1972; Buhles *et al*, 1974), si bien a los 20 días casi todos los perros suelen ser seropositivos, alcanzando valores máximos del título de anticuerpos a los 80 días después de la infección (Buhles *et al*, 1974; Maeda *et al*, 1987). El título de anticuerpos anti Ehrlichia persiste elevado mientras la infección perdure (Ristic *et al*, 1972; Buhles *et al*, 1974; Weisiger *et al*, 1975).

Como ocurre con otras enfermedades infecciosas, los altos títulos de anticuerpos no confieren inmunidad protectora por lo que una nueva exposición al agente causal podrá originar de nuevo el cuadro de ehrlichiosis, aunque suele cursar de un modo menos grave (Buhles *et al*, 1974; Weisiger *et al*, 1975).

Son dos las técnicas serológicas más empleadas para el diagnóstico de ehrlichiosis canina: la inmunofluorescencia indirecta y las técnicas de enzimoinmunoensayo.

La inmunofluorescencia indirecta (**IFI**) es la técnica más empleada tanto en medicina veterinaria como en medicina humana y presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *E. canis* (Ristic *et al*, 1972; Ristic y Holland, 1993; Waner *et al*, 2000b). En la actualidad, la IFI se sigue considerando la técnica diagnóstica de referencia (Neer *et al*, 2002). Emplea como antígeno cultivos celulares infectados (Dawson *et al*, 1991). En relación con su especificidad, se ha comprobado la ausencia de reacciones cruzadas con un gran número de agentes: *Leptospira canicola*, *Brucella canis*, herpesvirus canino, virus de la parainfluenza, *Borrelia burgdorferi* y diversas *Rickettsias* como *R. tsutsugamushi*, *R. canada*, *R. burnetti*, *R. mooseri*, *R. akari* (Ristic *et al*, 1972; Magnarelli y Anderson, 1993).

Se ha señalado la existencia de reacciones cruzadas entre diferentes especies de la familia *Ehrlichia*, siendo éstas más intensas entre las especies del mismo género, aunque los títulos son siempre más elevados para el agente que está causando la infección (Woody y Hoskins, 1991). Existe una fuerte reacción cruzada entre *E. canis* y *N. sennetsu* (Ristic *et al*, 1981), *E. chaffeensis* (Anderson *et al*, 1991; Dawson *et al*, 1991), *E. ruminantium* (Kelly *et al*, 1994b; Matthewman *et al*, 1994a) y más ligeramente con *N. helminthoeca* (Rikihisa *et al*, 1991).

Es importante señalar la ausencia de reacción cruzada entre *E. canis* y *E. platys* (Greene y Harvey, 1984) y entre *E. canis* y *A. phagocytophilum* (Ristic *et al*, 1976).

Recientemente se han comercializado pruebas serológicas de muestreo que emplean la tecnología **ELISA**, para su empleo rápido en la propia clínica veterinaria, con un valor cualitativo y no cuantitativo. Se ha observado una buena correlación entre los resultados de estas técnicas de ELISA y la inmunofluorescencia indirecta con una sensibilidad igual o superior al 71% y una especificidad que puede llegar al 100%. La sensibilidad de estas pruebas disminuye para valores del título de anticuerpos menores de 1:320 (Waner *et al* 2000b; Harrus *et al*, 2002), por lo que en caso de sintomatología compatible y resultado negativo, sería aconsejable repetir la prueba en una o dos semanas, para dar tiempo a un aumento significativo del título de anticuerpos en el caso de infecciones agudas.

Estas pruebas rápidas pretenden, ante todo, tener un valor orientativo, siendo la especificidad y sensibilidad superior en el caso de la IFI (Waner *et al*, 2000b; Harrus *et al*, 2002).

También se han utilizado, aunque con menos frecuencia, otras técnicas diagnósticas como el inmunoblot, con el que se puede detectar una banda polipeptídica de 25-kd en las fases precoces de la enfermedad (Nyindo *et al*, 1991). Con las técnicas de inmunoblot se puede tipificar con más precisión el agente causal, diferenciando entre las diferentes especies ehrlichiales que pueden dar una reacción serológica cruzada (Greene, 1995). Existen otros métodos útiles para la realización de muestreos amplios como la aglutinación

en placa de látex, si bien los resultados deben confirmarse posteriormente con la inmunofluorescencia indirecta.

3.9.3.2.3. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) es una técnica molecular basada en las propiedades bioquímicas del ADN, asociadas a la composición y secuencia de nucleótidos. La PCR emplea segmentos cortos y simples de nucleótidos, llamados cebadores, cuyas secuencias son complementarias de las secuencias del ADN del organismo que se investiga. La amplificación de los cebadores permite la identificación del ADN bacteriano. Los cebadores y otros reactivos necesarios para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa se añaden a un volumen de solución que contiene ADN representativo de la muestra de estudio, incluido ADN del hospedador y del microorganismo que se busca. La muestra puede ser cualquier tejido del hospedador que pueda portar al agente investigado (Sellon, 2003).

Los cebadores empleados para la detección de agentes ehrlichiales pueden ser genéricos o especie-específicos. Los laboratorios de diagnóstico suelen emplear cebadores genéricos y, cuando el resultado es positivo, emplean cebadores especie-específicos (Cohn, 2003). Existen variaciones de la técnica según los cebadores empleados, la concentración de los reactivos, la temperatura y/o la duración de cada ciclo. El protocolo a utilizar no está consensuado a nivel general para todos los laboratorios, debiéndose en cualquier caso optimizar y homogeneizar las condiciones de la técnica en cada laboratorio (Kakoma *et al*, 2000; Cohn *et al*, 2003)

Si bien en principio, el diagnóstico molecular parece el más específico y fiable en cuanto a la detección de organismos, tiene también sus limitaciones. Así la extremada sensibilidad de estas pruebas, puede conducir con facilidad a resultados falsos positivos por contaminación. Por otro lado, tras la muerte del microorganismo investigado, sus ácidos nucleicos pueden permanecer en el hospedador, sin que el periodo de permanencia de los mismos se conozca en la actualidad (Sellon, 2003).

Aunque es menos probable, se pueden observar falsos negativos debido a la presencia en la muestra de inhibidores de la PCR, como la heparina. También la elección de la muestra puede condicionar los resultados. Las ehrlichias y fundamentalmente *Ehrlichia canis* podrían permanecer secuestradas en células de tejidos del sistema mononuclear fagocitario (bazo, médula ósea); generalmente las muestras empleadas en el diagnóstico rutinario proceden de sangre del paciente, por lo que se podría obtener resultados negativos en sangre y existir *Ehrlichia canis* secuestrada en otros tejidos (Harrus *et al*, 1998a)

Al comparar la PCR con otras técnicas diagnósticas, se observa que su sensibilidad para la detección de *E. canis* tanto en sangre como en otros tejidos, parece ser similar o ligeramente inferior a la de otras técnicas de uso habitual como la IFI o el ELISA (Iqbal *et al*, 1994b; Iqbal y Rikihisa, 1994), por lo que las pruebas de diagnóstico molecular no deben suplir a las pruebas serológicas en el diagnóstico de la ehrlichiosis y deben considerarse pruebas complementarias a las tradicionalmente empleadas (Kakoma *et al*, 2000; Sellon, 2003).

El Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria recomienda que el empleo de técnicas de PCR para el diagnóstico de ehrlichiosis canina debe ir siempre acompañado de la realización de pruebas serológicas (Neer *et al*, 2002).

2.10. TRATAMIENTO DE LA EHRlichiosis CANINA

A lo largo de la historia y desde las primeras descripciones de la ehrlichiosis canina, se han empleado en el tratamiento de la ehrlichiosis un gran número de fármacos como el tripán azul, acaprina, gonacrina, sales orgánicas de antimonio y de arsénico y solución salina formolada, aunque con todos ellos, la respuesta fue decepcionante (Ewing, 1969; Ghorbel *et al*, 1993a). Algunos antimicrobianos como la sulfametacina, sulfameracina, sulfonamida y penicilina tampoco tuvieron éxito en el tratamiento de esta enfermedad (Ewing, 1969; Breitschwerdt, 1995).

La **tetraciclina** y los antibióticos de su familia han sido tradicionalmente los fármacos efectivos empleados para el tratamiento de la ehrlichiosis (Huxsoll *et al*, 1970; Bhules *et al*, 1974). Aunque la tetraciclina y la oxitetraciclina siguen manteniendo su eficacia, son la **doxiciclina** y la **minociclina** los fármacos de este grupo más empleados en la actualidad, debido a su excelente absorción y a su sencilla administración una vez al día (Shaw y Rubin, 1986; Troy y Forrester, 1990; Neer *et al*, 2002), en comparación con la dosificación de las otras tetraciclinas cada 8 horas y en ayunas. Además, la oxitetraciclina puede ser nefrotóxica, mientras que la baja toxicidad renal de la doxiciclina hace recomendable su empleo en perros con insuficiencia renal (Van Heerden e Immelman, 1979). Hay que tener en cuenta que cualquiera de los fármacos incluidos en este grupo de antibióticos produce decoloración dental en cachorros.

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 e 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). En cuanto a la duración del tratamiento, si en un principio se recomendaron tratamientos de 7 a 14 días (Neer, 1998; Breitschwerdt 1998a, Breitschwerdt, 1998b), la recomendación actual es la de mantener el tratamiento durante 28 días (Breitschwerdt, 1998b; Sainz *et al*, 2000c; Neer *et al*, 2002). Los protocolos de tratamiento más cortos pueden dar lugar a una mejoría inicial del paciente, pero los síntomas suelen volver a aparecer (Sainz *et al*, 2000c).

El **cloranfenicol** se ha venido empleando en cachorros, para evitar la coloración dental que se produciría al emplear tetraciclinas a esa edad, y en hembras gestantes o lactantes (Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991). Los protocolos utilizados varían de los 15 a los 50 mg/kg cada 8 horas durante 14 días, vía oral, intravenosa o subcutánea (Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991). Su efectividad es cada vez más controvertida (Brouqui y Raoult, 1992, Troy y Forrester, 1990) y ello, unido a su toxicidad sobre la médula ósea, hacen que no sea un fármaco de primera elección, sobretodo en perros anémicos y/o trombocitopénicos (Troy y Forrester, 1990).

Recientemente y también con el fin de evitar la coloración dental producida por la doxiciclina en niños, se ha empleado con éxito la **rifampicina** en el tratamiento de la ehrlichiosis granulocítica humana (Krause *et al*, 2003). Hasta el momento no se han encontrado estudios sobre el empleo de este antibiótico en el tratamiento de la ehrlichiosis canina.

El **dipropionato de imidocarb** es una diamidina que ha mostrado gran actividad tanto curativa como profiláctica en babesiosis canina (Kuttler, 1980). Durante más de 20 años, éste fármaco ha mostrado ser un efectivo tratamiento frente a la ehrlichiosis canina en dos dosis separadas de 5-7 mg/kg, vía intramuscular o subcutánea, cada 15 días (Matthewman *et al*, 1994b; Sainz *et al*, 2000c). Este fármaco es clínicamente tan eficaz como la doxiciclina, respondiendo favorablemente los perros al tratamiento en 24-72 horas, en el caso de formas agudas o crónicas leves. No obstante, se ha observado una

normalización más lenta, tanto del recuento plaquetario como del proteinograma, en aquellos casos tratados con dipropionato de imidocarb (Sainz *et al*, 2000c).

Con relativa frecuencia se presentan, tras la administración de dipropionato de imidocarb, efectos secundarios como disnea, sialorrea, diarrea, exudado nasal, taquicardia y temblores (Woody y Hoskins, 1991), que parecen ser debidos a un efecto anticolinesterasa provocado por el fármaco (Ogunkoya *et al*, 1981; Adenyanju y Aliu, 1982). Estos signos remiten tras la administración de sulfato de atropina a dosis de 0.05mg/kg (Ogunkoya *et al*, 1981).

Se han empleado protocolos que emplean conjuntamente doxiciclina y dipropionato de imidocarb; sin embargo, su administración conjunta no parece aportar beneficio por lo que no es aconsejable (Sainz *et al*, 2000c).

La **enrofloxacin**a para el tratamiento de la ehrlichiosis canina se ha empleado a dosis de 5 mg/kg cada 24 horas durante 15 días (Kontos y Athanasiou, 1998). Sin embargo, estudios posteriores demostraron la falta de respuesta a este fármaco de perros con ehrlichiosis (Neer *et al*, 1999). El empleo de ciprofloxacina para el tratamiento de la ehrlichiosis humana tampoco ha sido efectivo (Brouqui y Raoult, 1992).

No suele ser necesario instaurar un **tratamiento de apoyo** en el curso de la ehrlichiosis canina ya que la terapia específica por sí sola suele conseguir una buena respuesta. No obstante, según la gravedad del proceso pueden ser necesarios algunos tratamientos de soporte como fluidoterapia o transfusiones (Woody y Hoskins, 1991; Neer *et al*, 1998). Además, en ocasiones se necesita instaurar un tratamiento específico frente a determinadas complicaciones (como la glomerulonefritis) asociadas a una infección crónica por *E. canis* (Cohn, 2003).

En general, se recomienda evitar el uso de glucocorticoides, a no ser en caso de trombocitopenias o anemias graves que puedan condicionar la vida del animal, en las que

su empleo puede disminuir la destrucción inmunomediada de plaquetas o eritrocitos asociada a la infección (Grindem *et al*, 1999). La dificultad que, en ocasiones, existe para diferenciar la ehrlichiosis de otras anemias y/o trombocitopenias inmunomediadas o autoinmunes, también puede justificar, el empleo de glucocorticoides, a la espera de los resultados serológicos (Troy y Forrester, 1990; Neer *et al*, 1998; Frank y Breitschwerdt, 1999). Los glucocorticoides también pueden estar indicados en el curso de poliartritis, vasculitis o meningitis asociadas a la infección (Maretzki *et al*, 1994; Neer *et al*, 1998; Meinkoth *et al*, 1998). En todo caso, los corticoides se deben emplear siempre asociados al tratamiento específico frente a la ehrlichiosis ya que, de otra manera, podrían agravar la infección (Breitschwerdt, 2003).

2.10.1 EVOLUCIÓN POST-TRATAMIENTO

La evolución de la eficacia terapéutica debe abordar el estudio de diferentes aspectos. La mejoría clínica precede en el tiempo a la normalización de la analítica. En este sentido, a las 24-48 horas de iniciado el tratamiento suele apreciarse una mejoría clínica importante en perros en fase aguda o fase crónica leve de la enfermedad (Breitschwerdt *et al*, 1998b). Sin embargo, la eficacia clínica del tratamiento se puede retrasar incluso 6 semanas, en formas crónicas (Woody y Hoskins, 1991; Sainz, 1996).

Los parámetros laboratoriales que más rápidamente se normalizan son los recuentos de eritrocitos y de plaquetas, normalizándose habitualmente a los 14 días de tratamiento (Neer *et al*, 1998; Frank y Breitschwerdt, 1999; Neer *et al*, 2002). Incluso en casos crónicos, si el cuadro clínico y los parámetros hematológicos no mejoran en una o dos semanas desde el inicio del tratamiento, se debería reevaluar el diagnóstico, ya que la falta de mejoría puede ser debida a una infección crónica grave o a la existencia de coinfección con otro microorganismo o de una concurrencia con una enfermedad no infecciosa (Cohn, 2003). La mayoría de los casos que no responden al tratamiento, en ausencia de otra infección, presentan insuficiencia renal y/o aplasia medular severa (Sainz *et al*, 2000c).

El proteinograma tarda en normalizarse entre 3 y 9 meses, siendo empleado

rutinariamente para confirmar la presencia de una buena respuesta al tratamiento a largo plazo.

El seguimiento de la evolución de la enfermedad en base a una monitorización serológica se ve dificultada por el hecho de que, si bien los títulos de anticuerpos suelen empezar a disminuir entre 3 y 9 meses tras el tratamiento de la enfermedad, muchas veces pueden mantenerse elevados durante largos periodos de tiempo, incluso varios años, sin ninguna otra alteración clínica ni laboratorial (Perille y Matus, 1991; Bartsch y Greene, 1996; Harrus *et al*, 1998c; Frank y Breitschwerdt, 1999; Sainz *et al*, 2000c). Aún queda por determinar el significado real de esta persistencia en el título de anticuerpos.

En teoría, un buen método de elección para evaluar la persistencia de una infección por *Ehrlichia* sería la realización de PCR de un aspirado esplénico; otros tejidos que pueden emplearse para el PCR serían médula ósea o sangre, pero la sensibilidad de la técnica es inferior (Iqbal *et al*, 1994; Breitschwerdt *et al*, 1998b; Harrus *et al*, 1998a). La PCR debería negativizarse tras el tratamiento de la enfermedad; sin embargo no se han encontrado estudios que verifiquen esta afirmación. Se desconoce el tiempo de permanencia del ADN de *Ehrlichia canis*, tras un tratamiento eficaz, en el hospedador. Sin embargo, algunos autores aconsejan volver a tratar con igual o diferente protocolo aquellos animales tratados correctamente en los que la PCR sea positiva y no se observe una resolución clínica y laboratorial (Cohn, 2003).

2.11. PROFILAXIS

La transmisión obligada de la ehrlichiosis a través de garrapatas, exceptuando la transmisión por transfusión sanguínea, hace que la profilaxis de la infección esté dirigida al control de garrapatas. Para evitar la transmisión, es necesario impedir la alimentación de la garrapata, ya que es en ese periodo cuando se producirá la transmisión. Las medidas profilácticas también deben aplicarse a aquellos animales diagnosticados de ehrlichiosis debido al riesgo de reinfecciones que estos animales tienen, ya que normalmente el medio en el que residen continúa siendo el mismo y hay que romper la cadena epidemiológica.

Se han llevado a cabo diferentes estudios para valorar el tiempo necesario para la adquisición y transmisión de agentes infecciosos por garrapatas durante la alimentación de las mismas. En general esta transmisión es improbable para tiempos inferiores a 24 horas de permanencia de la garrapata fijada al hospedador, a partir de las 48 horas la transmisión es muy factible y el porcentaje de transmisión aumenta enormemente a partir de las 72 horas (Piesman y Spielman, 1980; Sood *et al*, 1997; Katavolos *et al*, 1998; Hodzic *et al*, 1998; Des Vignes *et al*, 2001). Estos estudios se han realizado sobre la transmisión de diferentes agentes rickettsiales, borrelias, babesias y *Anaplasma phagocytophilum*. Parece ser que el tiempo necesario para la transmisión de *A. phagocytophilum* puede ser ligeramente inferior al de otros agentes (Katavolos *et al*, 1998; Hodzic *et al*, 1998). Se han observado también variaciones en los tiempos de transmisión según la especie de garrapata y hospedador y según el estadio evolutivo de la garrapata (Kidd y Breitschwerdt, 2003). A conocimiento del autor no existen estudios realizados sobre los tiempos de transmisión de *E. canis* por *Rhipicephalus sanguineus*, aunque los resultados anteriores podrían ser extrapolables.

Rhipicephalus sanguineus, también conocida como garrapata marrón del perro, es el vector de *E. canis*, por lo que nos centraremos en esta garrapata para investigar los posibles tratamientos profilácticos.

El principal objetivo del tratamiento profiláctico debe ir encaminado a evitar la alimentación de la garrapata, bien a través de un efecto repelente, un efecto letal instantáneo o un efecto que permita la separación de la garrapata del hospedador antes del tiempo necesario para la transmisión del agente infeccioso, es decir, antes de 24 horas. A este principal objetivo ha de sumarse la obtención de un producto cuyo efecto perdure sobre el animal y carezca de toxicidad.

El único producto comercializado para perros que posee efecto anti-picadura y efecto activador de la separación de la garrapata del hospedador, unido a un efecto prolongado y un elevado margen de seguridad es el collar de amitraz (Folz *et al*, 1986; Elfassy *et al*, 2001; Bourdeau, 2002).

Con los piretroides y con el propoxur se observa un efecto knock down o de muerte rápida (Bourdeau, 1999). Los únicos productos comercializados con estos principios activos carecen de efecto residual sobre el animal, exceptuando dos productos con permetrinas (Defendog® de laboratorios Virbac y Exspot® de laboratorios Shering Plough). Sin embargo, no existen estudios, en conocimiento del autor, sobre la eficacia de estos productos comerciales en la prevención de infestaciones por *R. sanguineus*.

Se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la eficacia de distintos productos, comercializados en veterinaria, a la hora de repeler o matar rápidamente garrapatas que entran en contacto con perros. Muchos de estos estudios realizan una comparación de la eficacia de dos productos, aunque no siempre es fácil comparar los resultados de distintos trabajos, al existir una gran variación en los métodos y materiales (Kidd y Breitschwerdt, 2003). Según estos estudios los collares de amitraz, el fipronil, y la asociación de permetrina e imidacloprid serían eficaces en el control de infestaciones por *R. sanguineus* al menos en un 90% hasta 3 semanas después de la aplicación del primer

tratamiento (Hunter, 1997; Estrada-Peña y Ascher, 1999; Ahn *et al*, 2000; Young *et al*, 2003; Cruthers *et al*, 2003). El tiempo empleado por estos productos para matar las garrapatas se estima inferior a 24 horas.

Se ha observado que los collares con deltametrina poseen también actividad garrapaticida; sin embargo su eficacia es inferior a la de los collares con amitraz (Estrada-Peña y Ascher, 1999).

La evaluación comparada entre la aplicación de fipronil en spot-on y un collar de amitraz, muestra también un mayor efecto garrapaticida en los perros a los que se les aplicó amitraz (Gil *et al*, 1998).

Hasta el momento sólo se ha realizado un estudio de campo que haya investigado la eficacia de un producto en la prevención de la transmisión de *E. canis* por *R. sanguineus*. Los autores de este trabajo afirman que el empleo mensual de fipronil es efectivo en la prevención de la ehrlichiosis canina monocítica (Davoust *et al*, 2002).

Otro punto importante en la profilaxis de las infecciones transmitidas por garrapatas sería la actuación a nivel del medio ambiente y un buen medio para ello sería conseguir romper el ciclo biológico. Así el empleo de inhibidores de formas juveniles como el piriproxifeno en unión a un adulticida permitiría la inhibición de los huevos producidos por las garrapatas supervivientes (Bourdeau, 2002).

Finalmente, algunos autores han señalado la posibilidad de administrar con fines preventivos tetraciclinas a dosis bajas en zonas endémicas, con la controversia que estas medidas ocasionan debido a la posibilidad de crear resistencias (Neer *et al*, 2002)

2.12. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es un poderoso método analítico que permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica (Stewart, 1997). Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas a través de un amplio rango de propiedades biológicas (Rosell, 2002). Esta técnica tiene aplicación tanto cualitativa (presencia o no de un determinado tipo celular) como cuantitativa. Actualmente son los estudios cuantitativos los que más interés suscitan.

Su aplicación en medicina humana se encuentra dirigida a la identificación de inmunodeficiencias, caracterización de la respuesta inmunitaria frente a distintas enfermedades, monitorización de la condición clínica de pacientes con SIDA, caracterización del inmunofenotipo de leucemias y linfomas y monitorización de la respuesta en trasplante de órganos, (Knapp, 1992; Keren, 1994; Grindem, 1996; Shanahan, 1997). En medicina veterinaria su empleo se ha desarrollado considerablemente en la última década (Culmsee y Nolte, 2002) y de manera semejante a su aplicación en medicina humana, se ha empleado en el estudio de infecciones por los virus de la leucemia felina (FeLV) y de la inmunodeficiencia felina (FIV), en la evaluación de la respuesta al trasplante de órganos en modelos caninos y en la caracterización del inmunofenotipo en linfomas y en distintas infecciones (Bucci *et al*, 1998; Fuller *et al*, 1994; Chabanne *et al*, 2000; Bourdoiseau *et al*, 1997; Caswell *et al*, 1997; Culmsee *et al*, 2001; Weiss, 2001a; Weiss, 2001b; Weiss, 2001c; Weiss, 2002; Winnicka *et al*, 2002; Guglielmino *et al*, 2004).

Debido al creciente número de parámetros biológicos analizables y al desarrollo de citómetros de coste accesible, dotados de sistemas informáticos, a la vez de uso relativamente sencillo y de alta capacidad operativa, la citometría de flujo tiene en la actualidad un amplio abanico de aplicaciones en muchos campos básicos y clínicos, donde se requiera identificar células o partículas biológicas, caracterizar sus propiedades o respuestas funcionales y, en algunos casos, separarlas físicamente (Rosell, 2002).

La citometría de flujo permite realizar un estudio inmunofenotípico de diferentes poblaciones celulares (Stewart, 1997). El objetivo del estudio inmunofenotípico de células sanguíneas es enumerar (identificar y contar) los diferentes tipos de leucocitos.

La sangre se obtiene por punción venosa en tubos con el anticoagulante apropiado. Se realizan alicuotas de esta sangre en diferentes tubos y se enfrenta a diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con colorantes fluorescentes (fluorocromos). Se procede a la eritrolisis de las muestras y la suspensión celular atraviesa el citómetro de flujo, en flujo continuo, célula a célula (Calvelli *et al*, 1993). Las células y los fluorocromos que llevan adheridos interactúan con la luz láser cuando pasan a través de la misma. La emisión fluorescente y la luz dispersada por las células es recogida y convertida en señales electrónicas en el citómetro de flujo (McKoy, 1994).

Durante el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo se identifican de 4 a 5 características diferentes de cada célula al tiempo que ésta fluye a través del haz de luz láser. La luz dispersada es recogida desde dos ángulos: uno a 0° en la misma dirección del haz de luz, llamado dispersión frontal de luz láser (FS) y otro a 90° del haz, llamado dispersión lateral de luz láser (SS). La información electrónica es digitalizada para su análisis inmediato o almacenada en forma de lista de datos que puede ser analizada posteriormente con un programa de análisis de datos (Grindem, 1996; Stewart, 1997).

Esta técnica es capaz de llevar a cabo la identificación de células gracias a la combinación de sus propiedades de dispersión de la luz y a sus antígenos de superficie unidos a anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (Shanahan, 1997).

Todos los componentes del citómetro de flujo requieren ser evaluados por un adecuado programa de control de calidad.

El citómetro de flujo emplea una luz láser monocromática, con una única longitud de onda, altamente focalizada y polarizada. La morfología celular se determina por la observación de las diferencias en la dispersión de la luz entre las células. También realiza una lectura de la intensidad de fluorescencia celular, permitiendo una medida cuantitativa de la tinción celular. Con esta tecnología se pueden analizar un gran número de células, aproximadamente 1000 células al segundo.

El estudio inmunofenotípico por citometría de flujo sigue los siguientes pasos:

1. Las células son identificadas por sus propiedades de dispersión de la luz.
2. A continuación son definidas por su unión a anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos.

El poder de esta técnica reside en su capacidad de análisis multiparamétrico de cada célula. Combinando las propiedades de dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia sobre todas y cada una de las células, las poblaciones celulares con características comunes pueden ser identificadas y cuantificadas (Shanahan, 1997).

La dispersión de la luz se emplea para diferenciar las células por tamaño, contorno o complejidad interior (granularidad). La combinación de la dispersión frontal y lateral de la luz se recoge y analiza en cada célula (McKoy, 1994).

La dispersión frontal de la luz se encuentra relacionada con el tamaño celular, mientras que la dispersión lateral de la luz corresponde al contorno y complejidad celular interna (McKoy, 1994). Los linfocitos dispersan poca luz frontal y lateralmente, ya que son pequeños, de contornos suaves y de escasa granularidad. Los granulocitos son grandes y tienen núcleos multilobulados y numerosos gránulos intracitoplasmáticos por lo que dispersan gran cantidad de luz tanto en dirección frontal como lateral. Los monocitos se

encuentran entre medias de ambas poblaciones, son más grandes que los linfocitos y menos complejos internamente que los granulocitos (Gráficos 2 y 3).

El registro de dispersión de luz coloca cada uno de los ángulos de dispersión en un eje de coordenadas, siendo indiferente su disposición (Stewart, 1997).

Los datos pueden ser emitidos como histogramas monoparamétricos o biparamétricos. Los histogramas monoparamétricos son curvas de probabilidad en los que el número de células o eventos son puntuados según la intensidad de la señal. Los histogramas biparamétricos muestran la relación entre dos características celulares independientes (Owens y Locken, 2002).

2.12.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE POR INMUNOFLUORESCENCIA

Diferentes determinantes celulares de superficie de origen proteico, lipídico o glucídico pueden ser empleados para identificar tipos celulares específicos. Los anticuerpos monoclonales vienen definidos por su capacidad de unión específica a esos determinantes. Los anticuerpos monoclonales son conjugados con fluorocromos que permiten su identificación a través de la emisión de fluorescencia (Keren, 1994; Stewart, 1997). La excitación de los fluorocromos por una fuente de luz monocromática produce la emisión de luz en un espectro característico, identificable en un citómetro de flujo o en un microscopio de fluorescencia. Cada célula es analizada en base a la existencia o ausencia de emisión de fluorescencia, lo que está relacionado con sus características de membrana.

Los fluorocromos más habituales para estudios de inmunofluorescencia de dos colores son el Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la ficoeritrina (PE).

El fluorocromo FITC emite luz verde y el PE, luz roja, cuando son excitados por el haz de luz láser del citómetro de flujo.

La Fluoresceína – es una pequeña molécula que puede ser fácilmente conjugada con proteínas gracias a un grupo isotiocianato. Es excitable a 488nm (láser de argón) y la emisión máxima de fluorescencia se produce a 530nm, por lo que esta fluorescencia es verde para el ojo. Sin embargo, también es emitida por esta molécula cierta cantidad de luz amarilla y naranja. Es muy estable en pH neutro, pero en condiciones ácidas su fluorescencia se reduce (Owens y Loken, 2002).

La Ficoeritrina - es una molécula grande (más grande que la IgG) que aparece de forma natural como parte del aparato fotosintético de bacterias, algas y plantas. Es excitable a 488nm y su espectro de emisión máxima de fluorescencia se sitúa en los 575nm. La conjugación de ficoeritrina a anticuerpos es mucho más compleja que la de fluoresceína. Sus propiedades fluorescentes son bastante independientes del pH, aunque un pH extremo puede disociarla (Owens y Loken, 2002).

La emisión del espectro de luz de la fluoresceína y la ficoeritrina son diferenciables y el pico de emisión se encuentra claramente distanciado por lo que estos fluorocromos pueden emplearse conjuntamente.

En la página siguiente podemos observar un gráfico ilustrativo de los espectros de emisión de tres fluorocromos diferentes.

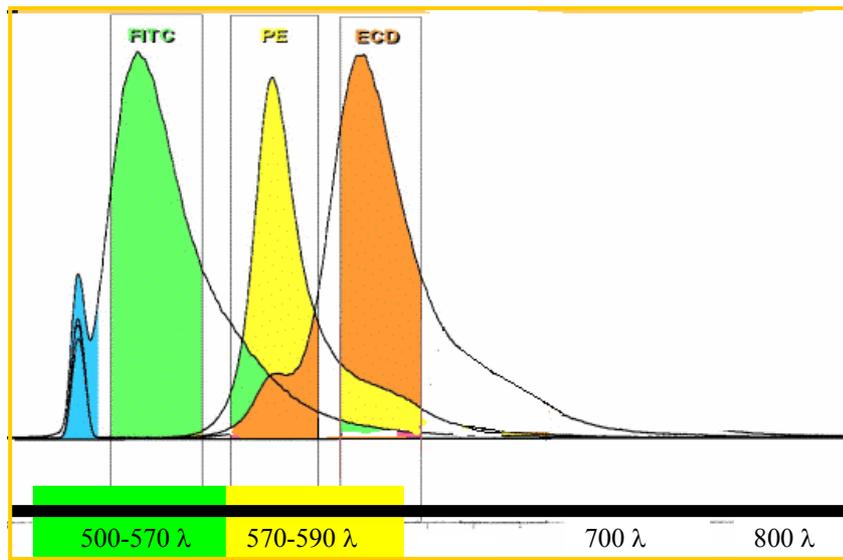


Gráfico 2.12.1.- Espectro de emisión de tres fluorocromos tras la excitación con el láser de 488 nm. (FITC = isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; ECD = energy coupled dye®).

2.12.2 COMPONENTES DEL CITÓMETRO DE FLUJO

Los componentes de un citómetro de flujo que, con mayor o menor complejidad técnica, se encuentran en la mayoría de los instrumentos actuales se representan en el dibujo 2 y son:

2.12.2.1. Sistema óptico

La óptica del citómetro de flujo enfoca la iluminación de las partículas, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso (Owens y Loken, 2002).

El sistema óptico incluye tanto los componentes para la manipulación del haz de luz láser para la iluminación de las células como las lentes de recolección de luz, los filtros

y los detectores empleados para recoger las señales procedentes de las células (Stewart, 1997)

2.12.2.2. Sistema de iluminación

Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayoría de los citómetros utilizan luz láser, por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio (Owens y Loken, 2002).

El citómetro puede disponer de un solo haz de luz láser (en ese caso su longitud de onda es de 488nm) o tener más de un haz de luz láser, lo que permite emplear fluorocromos excitables a longitudes de onda diferentes de 488nm.

2.12.2.3. Sistema hidráulico

Rodea la suspensión celular en flujo con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra a velocidad constante, a través de la zona de detección (cámara de flujo), donde las células son expuestas una a una al haz iluminador (Owens y Loken, 2002).

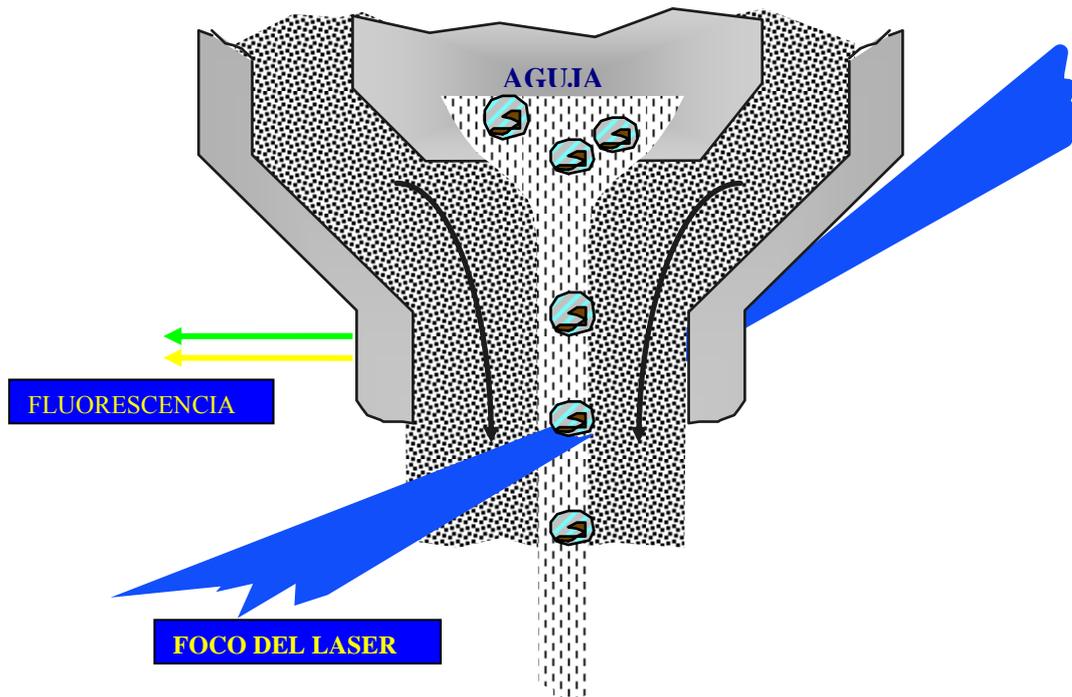


GRÁFICO 2.12.2- Esquema que ilustra el paso de células por el sistema hidráulico en forma de flujo individual y la incidencia del haz de láser sobre cada una de estas células.

2.12.2.4. Sistema electrónico

Procesa las señales procedentes de los fotodetectores, es decir, se encarga de la detección y amplificación de la señal en forma analógica y la posterior transformación de la señal analógica en digital. El sistema electrónico también controla el proceso de separación celular (*Cell Sorting*).

Existen dos tipos de fotodetectores empleados en los citómetros de flujo: los fotodiodos y los tubos fotomultiplicadores.

- Los fotodiodos son empleados como detectores de dispersión de luz frontal, ya que su baja sensibilidad es compensada por la intensidad de la luz láser.
- Los tubos fotomultiplicadores (PMT) son detectores de alta sensibilidad y se emplean como detectores de dispersión lateral de luz y detectores de fluorescencia.

Los fotodetectores convierten los fotones recibidos por el detector en impulsos eléctricos proporcionales en magnitud al número de fotones recibidos. Cada fotodetector medirá una característica celular distinta, por lo que se emplearán tantos fotodetectores como características celulares se quieran analizar en cada protocolo (Stewart, 1997).

La transformación de la señal analógica en digital se lleva a cabo por un conversor analógico-digital.

2.12.2.5. Sistema de adquisición y análisis de datos

Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo lista, así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas (*gating*). Los datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones (Owens y Loken, 2002).

La mayoría de los citómetros son compatibles con ordenadores y sistemas operativos comunes (plataformas MS-DOS, Windows y McIntosh).

2.12.3 GRÁFICOS ANEXOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

(Gráficos e imágenes cedidos por Coulter-Beckman ®)

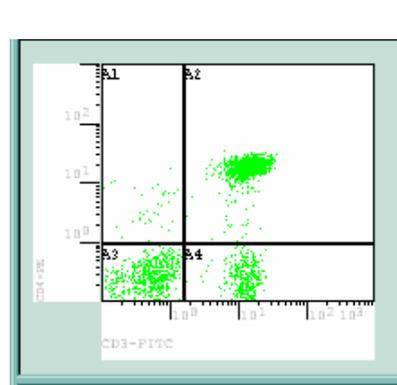
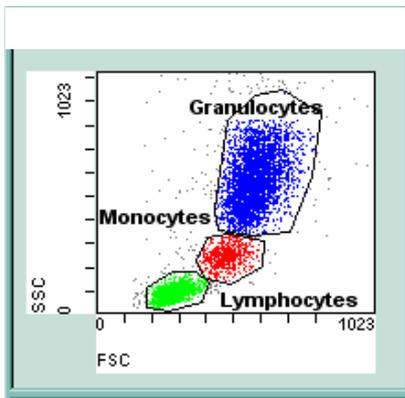
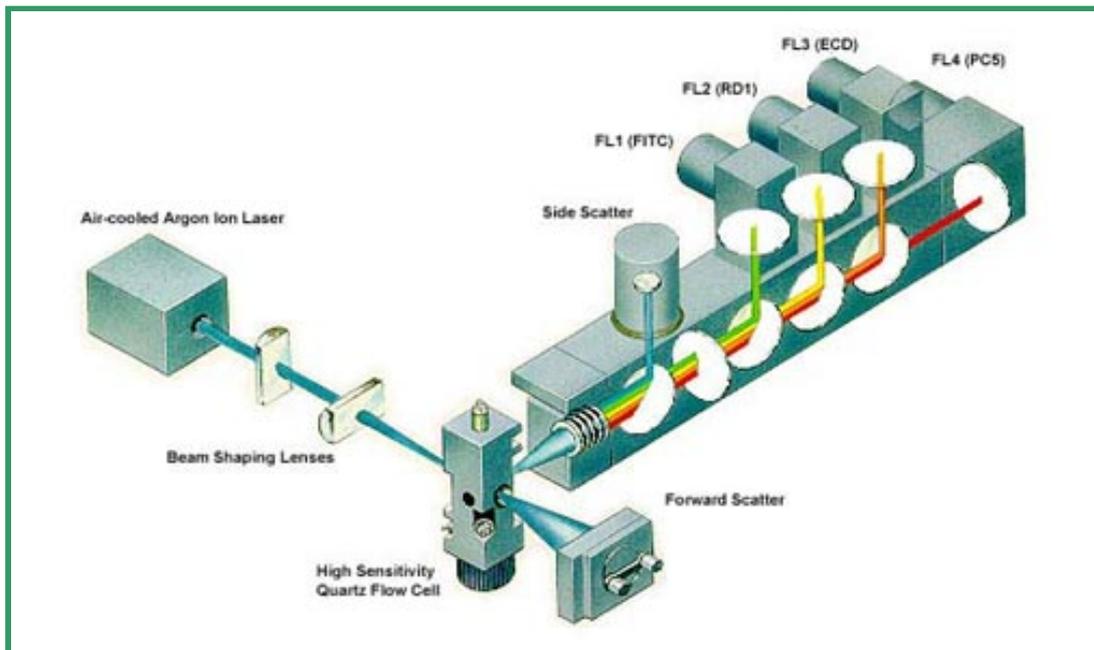


GRÁFICO 2.12.3.- Representación biparamétrica en función de la dispersión frontal y lateral, análisis morfológico de las poblaciones celulares.

GRÁFICO 2.12.4.- Representación biparamétrica de la fluorescencia emitida por la población sesgada de linfocitos.



DIBUJO 2.12.5.- Esquema de un citómetro de flujo. En él se representan los diferentes componentes del citómetro: Sistema de iluminación: foco de luz láser (*Air-cooled argon ion laser*). Sistema hidráulico (*high sensitivity quartz flow cell*). Sistema óptico: filtros, fotodiodos o receptores de dispersión frontal de luz láser (*Forward scatter = FS*), fotomultiplicadores o detectores de dispersión lateral de luz láser (*Side scatter = SS*) y de fluorescencia. Existen diferentes fotomultiplicadores para la detección de fluorescencia, del FL1 al FL4; cada uno de ellos recibe la dispersión procedente de diferentes longitudes de onda emitida por los diferentes fluorocromos empleados. El FL1 recibe fluorescencia entre 500 y 550 λ y se emplea para la recepción de fluorescencia procedente de la fluoresceína; y el FL2 entre 550 y 600 λ y se emplea para la detección de fluorescencia procedente de la ficoeritrina.



FOTO 2.12.1.- Imagen de los componentes de un citómetro de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PLAN DE TRABAJO

Ante los objetivos planteados en la introducción de este estudio nos propusimos el siguiente plan de trabajo:

- Selección de poblaciones caninas mantenidas en condiciones similares a partir de las cuales se pudiesen localizar individuos con ehrlichiosis e individuos sanos y sobre los cuales se pudiese aplicar el tratamiento previsto en este estudio.
- Inclusión y exclusión de los individuos objeto del estudio en base al examen clínico general, resultados de la serología por inmunofluorescencia indirecta frente a *Ehrlichia canis* y los criterios de selección detallados en el apartado siguiente.
- Organización de un plan de trabajo encaminado a la realización del tratamiento y de los sucesivos controles incluyendo las extracciones de sangre pertinentes a los animales para el procesamiento simultáneo de la sangre para hematología y citometría de flujo.
- Estudio comparativo de datos hematológicos y de la distribución de las poblaciones linfocitarias en animales sanos y animales con ehrlichiosis, así como el análisis de las posibles correlaciones entre los distintos parámetros biopatológicos investigados.
- Estudio analítico sobre la evolución de datos hematológicos y de las poblaciones linfocitarias en animales con ehrlichiosis tras la instauración de un tratamiento con dipropionato de imidocarb.

3.2. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los animales incluidos en el estudio se seleccionaron de dos protectoras de la provincia de Valencia:

- Protectora Jaime Ortola en el término Municipal de Torrent (Valencia), la cual contaba con 133 animales. Las condiciones de los animales eran similares entre sí, encontrándose alojados la mitad de ellos en jaulas colectivas con terreno de campo y zona de descanso cementada y la otra mitad alojados en vivienda y terreno circundante en régimen de libertad.
- Sociedad Valenciana Protectora de Animales y Plantas (SVPAP) ubicada en el término Municipal de Paterna (Valencia), la cual contaba con 250 perros acogidos, alojados todos ellos en jaulas colectivas pavimentadas con cemento.

Se contó con el consentimiento informado de los responsables de ambas colectividades para la realización de todo este estudio.

Los animales fueron incluidos en dos grupos, atendiendo a los siguientes criterios:

1. **Grupo 1 o grupo Control** de animales sanos. Los criterios de inclusión de animales para el grupo 1 fueron:
 - Los perros debían presentar un título de anticuerpos determinado por inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a *Ehrlichia canis* negativo.
 - También debían presentar un título de anticuerpos por IFI frente a *Leishmania infantum* negativo.
 - Debían estar libres de sintomatología clínica.
 - Su exploración física general debía ser normal.
 - En los frotis sanguíneos no se debían observar parásitos hemáticos.

2. **Grupo 2 o grupo con Ehrlichiosis**, constituido por perros afectados en fase subclínica y que serían objeto de tratamiento con dipropionato de imidocarb. Los criterios de inclusión de animales para el grupo 2 fueron:
- Los animales deberían presentar un título de anticuerpos por IFI frente a *Ehrlichia canis* superior a la dilución 1/80.
 - Deberían presentar un título de anticuerpos por IFI frente a *Leishmania infantum* inferior a la dilución 1/100.
 - En los frotis de sangre no se debía observar la presencia de parásitos hemáticos.
 - Se incluirían en este grupo animales libres de sintomatología, que llevaran más de 9 meses en la protectora y que no hubieran sido tratados anteriormente frente a ehrlichiosis.

Con el fin de clasificar a los perros en estos 2 grupos, se llevó a cabo una anamnesis detallada a los responsables de las colectividades, así como una exploración física completa y una analítica sanguínea a todos los perros de las protectoras.

El estudio se llevó a cabo en dos años consecutivos, iniciándose en ambas protectoras a finales del mes de septiembre. Concretamente, el estudio se comenzó en la protectora Jaime Ortola, analizando un total de 117 perros, y al año siguiente se repitió el mismo trabajo en la SVPAP donde se estudiaron 43 animales. Finalmente, el número de perros incluidos en el grupo con ehrlichiosis fue de 38 (25 de la protectora Jaime Ortola y 13 de la SVPAP), mientras que en el grupo control se incluyeron 18 (12 de la protectora Jaime Ortola y 6 de la SVPAP).

Estas protectoras carecían inicialmente de programas profilácticos intensivos frente a infestaciones por garrapatas, debido a la escasez de recursos económicos con que cuentan, la gran colectividad de la que se trata y el tránsito continuo de animales. En todos los animales residentes en las colectividades se realizó una profilaxis intensiva encaminada a eliminar la infestación por garrapatas que padecían así como a evitar la posible existencia de nuevas infestaciones por garrapatas durante el estudio. El objetivo de estas medidas era

intentar evitar reinfecciones por *Ehrlichia canis*. El tratamiento profiláctico consistió en la aplicación mensual de un spray de flumetrina al 0,3% y en la colocación de un collar antiparasitario de amitraz (Kiltix®) o de deltametrina (Scalibor®) a todos los animales incluidos en la investigación.

3.3. TRATAMIENTO

Los animales incluidos en el Grupo 1 no recibieron tratamiento alguno. Sin embargo, los perros del Grupo 2 fueron tratados con dos inyecciones subcutáneas de dipropionato de imidocarb (Imizol®) separadas por 15 días a dosis de 5mg/kg. El primer día de inoculación del producto al animal se consideró el día 0 del estudio en ese animal. Para paliar el dolor que se produce por la inyección de este fármaco, se diluyó en suero fisiológico al 50% y se añadieron 0,5 ml de lidocaína por inyección.

3.4. PLANIFICACIÓN DE LOS CONTROLES

Todos los animales incluidos en el estudio fueron sometidos a unos controles programados, en los cuales, además de realizar una exploración física completa, se recogían muestras de sangre habitualmente de la vena yugular, si bien en aquellos animales en los que este procedimiento se veía dificultado, la extracción se hizo de la vena cefálica.

En cada control se realizaba una hematología completa, proteínas totales, albúmina, globulinas y serología frente a *Ehrlichia canis* y frente a *Leishmania infantum* por IFI. Además, se llevaba a cabo un estudio de las poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo.

En los animales incluidos en el Grupo 1 (grupo control) se realizó una sola extracción de sangre). En los perros pertenecientes al Grupo 2 (grupo de tratamiento) se

planificaron unos controles programados que estuvieron sujetos a algunas pequeñas variaciones, en función de la disponibilidad tanto de los responsables de las colectividades caninas como de los propios perros. Concretamente, en estos animales del grupo 2, se llevaron a cabo 5 controles a lo largo del estudio:

- T0 (día 0): control realizado previamente a la primera inyección de dipropionato de imidocarb.
- T1: control realizado a los 15 días después de la primera inyección de dipropionato de imidocarb
- T2: control realizado en torno de los 30 días después de la primera inyección de dipropionato de imidocarb.
- T3: control realizado aproximadamente a los 90 días después de la primera inyección de dipropionato de imidocarb.
- T4: control realizado hacía los 180 días después de la primera inyección de dipropionato de imidocarb.

3.5. RECOLECCIÓN DE LA SANGRE

La sangre, una vez extraída, se distribuía en tres tubos, dos con anticoagulante EDTA (tetra-acetato de etilenediamina) y otro para extracción de suero con gel que facilitaba la separación del mismo.

Las muestras con EDTA eran mantenidas a temperatura ambiente y en posición horizontal hasta su procesamiento en el laboratorio. Una de las muestras en EDTA se empleó para la realización de la hematología completa y la otra, para citometría de flujo. La muestra para hematología se procesaba siempre antes que la de citometría de flujo, pudiendo existir una variación máxima entre ambos análisis de +/- 3 horas. Desde su extracción hasta el procesamiento pasaban un máximo de 6 horas (Calvelli *et al*, 1993).

La muestra para separación del suero se transportaba en posición vertical y a temperatura ambiente hasta la llegada al laboratorio donde se procedía a centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos. Una vez extraído el suero, se realizaban dos alícuotas y se congelaban a -80°C hasta su procesamiento para serología y bioquímica.

3.6. HEMATOLOGÍA COMPLETA

Para la realización de la hematología completa se empleó un analizador hematológico automático (Sysmex F-820®). Los parámetros medidos por el analizador fueron:

- Recuento de hematíes
- Hematocrito
- Hemoglobina
- Volumen corpuscular medio (VCM)
- Hemoglobina corpuscular media (HCM)
- Concentración media de la hemoglobina corpuscular (CMHC)
- Recuento de leucocitos
- Recuento plaquetario

Para el recuento diferencial de blancos se procedió a la realización de extensiones sanguíneas a partir de la sangre conservada en EDTA a la llegada al laboratorio. Una vez realizada la extensión sanguínea se procedía a fijarla y teñirla con tinción panóptica. Una vez teñidas las extensiones se montaban con Acrytol® y se conservaban hasta su lectura. Se realizaba estudio microscópico del frotis sanguíneo, llevando a cabo un recuento celular de 100 células nucleadas, obteniendo el recuento diferencial de las poblaciones leucocitarias: neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos.

3.7. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Se valoraron, en muestras séricas, proteínas totales, albúmina, globulinas y cociente Albúmina/Globulinas. La determinación de las proteínas totales y la albúmina en suero se realizó por bioquímica húmeda medida en un espectrofotómetro helios α ® (Thermo Espectronic®). Se emplearon reactivos para proteínas totales y albúmina de la marca Spinract ®.

Una vez obtenidos los valores de proteínas totales y albúmina, las globulinas se obtuvieron por diferencia entre proteínas totales y albúmina. Posteriormente, se procedía al cálculo del cociente Albúmina/ Globulinas.

3.8. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO: INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

El diagnóstico inmunológico fue realizado por el Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

La técnica empleada tanto para el diagnóstico de ehrlichiosis como de leishmaniosis fue la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Su fundamento está basado en el empleo de la fluoresceína como sustancia fluorescente que se puede unir a anticuerpos sin variar su especificidad. En el desarrollo de dicha técnica, se enfrenta en una primera fase el suero problema con el antígeno. En el caso de que en el suero problema se encuentren anticuerpos específicos, estos se visualizarán tras añadir un suero antiglobulina específica, conjugado con un fluorocromo (Coligan *et al*, 1992)

3.8.1. ANTÍGENO EMPLEADO

Para el diagnóstico serológico de *Ehrlichia canis*, se ha empleado como antígeno sobrenadante de la línea celular DH-82 infectada por *E. canis* (Dawson *et al*, 1991). El porcentaje de células infectadas en el cultivo era de, aproximadamente, el 60% del total.

Para el diagnóstico serológico de *Leishmania infantum*, se han utilizado promastigotes en cultivo NNN.

El protocolo de fijación del antígeno en los portas y de la propia técnica de IFI es el mismo, independientemente del antígeno empleado. Inicialmente, se purifican los antígenos para evitar reacciones con antígenos solubles, mediante centrifugación (a 500 g durante 5 minutos) y lavados sucesivos en PBS hasta la obtención de un sobrenadante limpio.

La suspensión celular se coloca en portas especiales esmerilados de inmunofluorescencia de 18 pocillos de 4 mm de diámetro (Cultek). En cada pocillo se depositan 5 microlitros del antígeno en suspensión y se dejan secar al aire. Las preparaciones, una vez secas, se almacenan congeladas a -20°C. En el momento de su uso, los portas se descongelan y se dejan secar en estufa a 37°C durante 15 minutos.

3.8.2. TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La técnica incluye los dos tiempos de reacción clásicos: un primer tiempo en el que se ponen en contacto el antígeno con los sueros problema y un segundo tiempo en el cual se añade la anti-inmunoglobulina canina conjugada con el marcador fluorescente (Coligan *et al*, 1992)

-Primer tiempo de reacción

En las microplacas los sueros problema se diluyen en tampón fosfato (PBS) a pH de 7,2. Las diluciones empleadas para *Ehrlichia canis* fueron de 1:40, 1:80 y 1: 320. El punto de corte se encuentra en 1:40 (Sainz, 1996).

En el caso de *Leishmania infantum*, las diluciones empleadas fueron 1:50, 1:100 y 1:400. El punto de corte para el diagnóstico de leishmaniosis canina en el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Madrid se encuentra en 1:100 (Tesouro, 1984).

En todo momento se incluyeron controles positivos y negativos, previamente contrastados, propiedad del Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la UCM.

A continuación, los portaobjetos se introducían en cámara húmeda en estufa a 37°C durante 30 minutos. Tras esta fase de incubación, los portas se sometían a tres lavados de 5 minutos en PBS en agitación, cambiando la solución de PBS entre cada lavado. Posteriormente, los portas se secaban con aire frío.

-Segundo tiempo de reacción:

Tras su secado, se añadían a cada pocillo 25 microlitros de conjugado; este conjugado está constituido por una anti-Ig de perro obtenida en conejo y marcada con isotiocianato de fluoresceína (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) a una dilución de 1:100 en PBS a pH=7,2. A continuación y al igual que en el primer tiempo de reacción, se introducían los portas en cámara húmeda en estufa a 37°C durante 30 minutos.

Tras tres lavados en PBS y su correspondiente secado, las preparaciones se montaban para su lectura, colocando 3 gotas de glicerina tamponada especial para inmunofluorescencia (Fluoprep®, Biomérieux) y, sobre ellas, un cubreobjetos.

-Lectura

La lectura se realiza con un microscopio de epifluorescencia (Olympus B-H2 ®) con filtro azul, empleando el objetivo de x40 aumentos. Se comienza observando los pocillos controles para comprobar su positividad o negatividad; a continuación se leen los sueros problemas. El título de anticuerpos es la máxima dilución del suero a la cual se detecta una fuerte fluorescencia.

3.9. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo fue realizada por el Servicio de Citometría de flujo de la Facultad de Medicina de Valencia. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL con cargador automático de muestras.

Los parámetros del análisis incluyen:

1. Dispersión frontal de luz láser (FS): es proporcional al tamaño de la partícula analizada. Es recogida y amplificada por un fotodetector dotado de un filtro de densidad neutra (NDI).
2. Dispersión lateral de luz láser (SS): es proporcional a la granularidad o complejidad de la partícula analizada. Es recogida y amplificada en dirección perpendicular al haz de láser mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros: 488DC + 488BP.
3. Fluorescencia verde (Log FL1): es proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína (FITC) o a la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Es recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros 550DC + 525BP.

4. Fluorescencia amarilla-anaranjada (Log FL2): es proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina (PE) o a la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Es recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros: 575DC + 550BP

Las señales de dispersión luminosa y de intensidad de fluorescencia son calibradas diariamente en los fotomultiplicadores logarítmicos, utilizando microesferas (Flow-Check Beckman-Coulter, Hialeah, FL).

Los datos fueron adquiridos en forma de histogramas (mono y biparamétricos) y en “modo lista”. La adquisición en “modo lista” permite el análisis posterior de los datos utilizando el software System II® (Beckman-Coulter, Hialeah FL), en el cual es posible recombinar los parámetros obtenidos y redefinir diferentes regiones de selección.

Mediante el ordenador del citómetro (programa System II v. 3.0) se define un protocolo de adquisición de datos que incluye los siguientes histogramas:

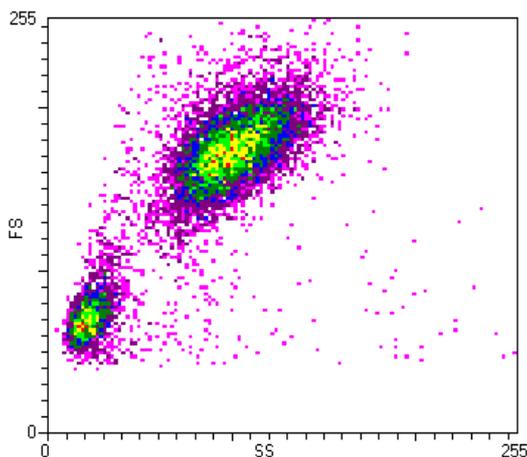


Fig. 3.9.1.- Histograma biparamétrico de FS frente a SS.

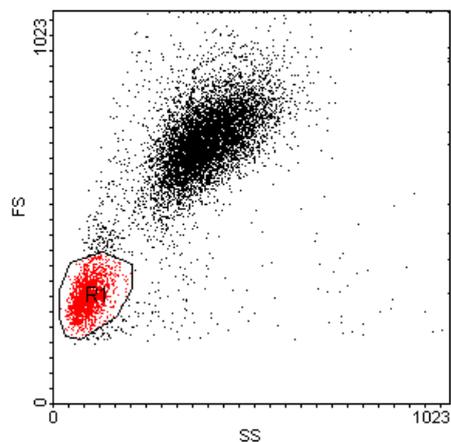


Fig. 3.9.2.- Acotamiento de la ventana de linfocitos sobre el histograma morfológico.

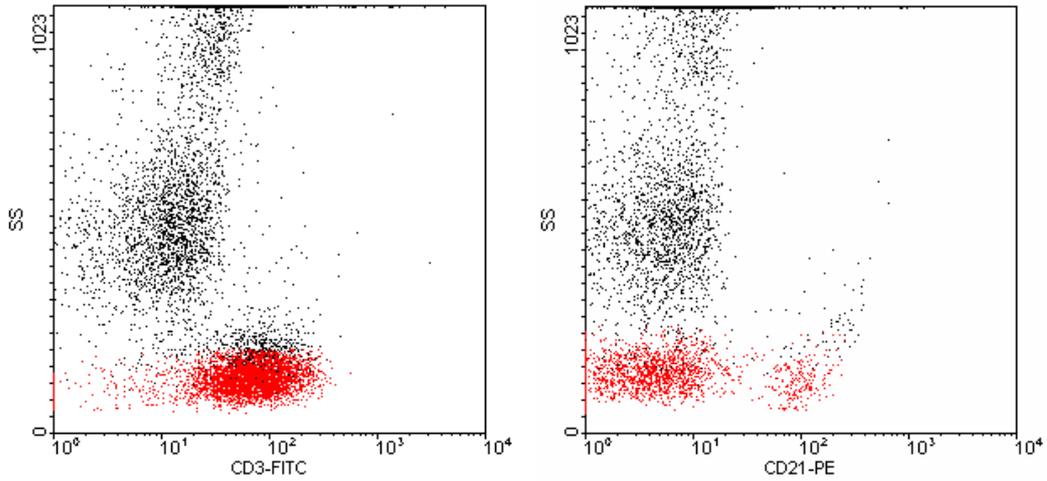


Fig. 3.9.3 y 3.9.4.- Histogramas biparamétricos de SS frente a CD3 y CD21 que muestran como las células positivas a CD3 y CD21 se corresponden morfológicamente con linfocitos.

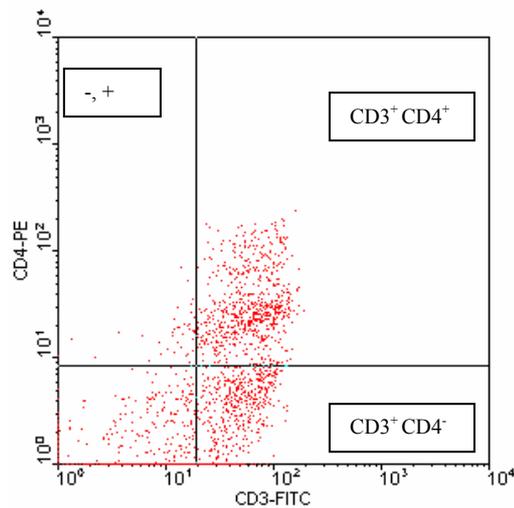


Fig. 3.9.5.- Histograma biparamétrico de CD4 frente a CD3, se incluyen únicamente las células acotadas en la región de linfocitos.

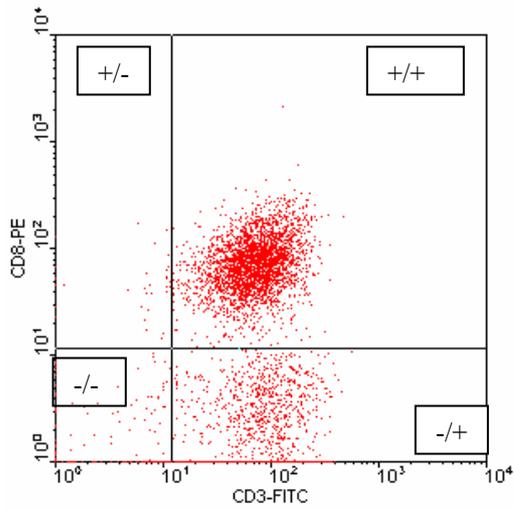


Fig. 3.9.6.- Histograma biparamétrico de CD8 frente a CD3, se incluyen únicamente las células acotadas en la región de linfocitos.

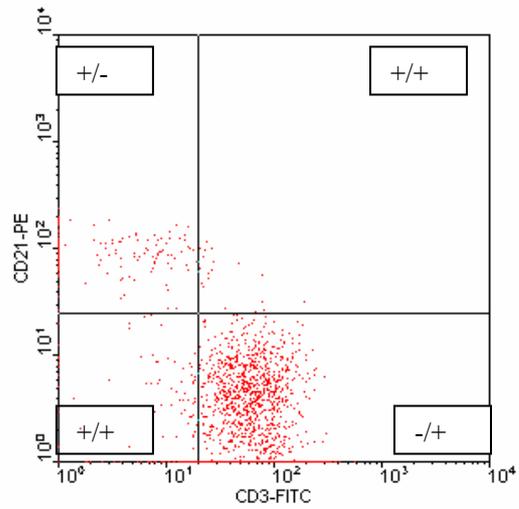


Fig. 3.9.7.- Histograma biparamétrico de CD21 frente a CD3, se incluyen únicamente las células acotadas en la región de linfocitos.

La adquisición fue como mínimo de 10.000 eventos sobre el histograma de leucocitos, utilizando los distintos anticuerpos monoclonales siempre combinados con el anticuerpo monoclonal CD3. Los parámetros citométricos se analizaron a partir de ficheros almacenados en forma de matriz multidimensional (modo lista), que permite reproducir de forma rápida y en tiempo diferido el proceso de análisis, así como modificar, en caso necesario, las regiones acotadas inicialmente. La visualización y el análisis de los datos, se realiza en programas de análisis celular compatibles con la configuración de los citómetros empleados (Cytologic, XL Worxs station).

En nuestro caso se realizaba una primera clasificación según la dispersión luminosa. La sección donde se disponían los linfocitos se delimitaba para crear unos márgenes de la máxima confianza y con los datos de esa ventana se estudiaba la fluorescencia emitida (Loken *et al*, 1990).

3.10. ANTICUERPOS MONOCLONALES (MAB)

Los anticuerpos monoclonales (Mab) caninos empleados en este estudio (antiCD3, antiCD4, antiCD8 y antiCD21) fueron proporcionados por el Dr. Peter F. Moore del College of Veterinary Medicine de la Universidad de Davis (California). Estos anticuerpos monoclonales fueron sintetizados en su propio laboratorio. Concretamente, los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio fueron el 2A12; 1E4#3; JD3 y 1D6#12 que reconocen los antígenos CD3, CD4, CD8 y CD21 respectivamente. Las especificidades de estos anticuerpos se establecen por inmunoprecipitación antigénica, por inmunohistoquímica realizada en tejidos linfoides y por citometría de flujo realizada en células derivadas de órganos linfoides centrales y periféricos y estudios funcionales de subpoblaciones periféricas de células T definidas por estos anticuerpos (Moore *et al*, 1992).

En la siguiente tabla, se incluyen los clones concretos de anticuerpos monoclonales empleados, así como su especificidad, isotipos y fluorocromos con los que estaban marcados.

Monoclonal	Especificidad	Clon	Isotipo	Fluorocromo
CD3	Linfocitos T	CA 17.2A12	Ig G1	FITC
CD4	Linfocitos T auxiliares	CA 13.1E4#3	Ig G1	PE
CD8	Linfocitos T citotóxicos	CA9.JD3	Ig G2a	PE
CD21	Linfocitos B	CA2.1D6#12	Ig G1	PE

Tabla 3.10.1: Monoclonales empleados en el estudio

Se empleó el antiCD3 como marcador de linfocitos T (Weiss 2001c), el antiCD21 como marcador de linfocitos B, y el antiCD4 y antiCD8 para diferenciar subpoblaciones de linfocitos T, según sean portadoras de CD4 (linfocitos T cooperadores o Th) o de CD8 (linfocitos T citotóxicos o Tc).

Nuestro plan de trabajo consistió en enfrentar el antiCD3 a cada uno de los otros anticuerpos monoclonales, por lo que necesitábamos marcarlos con dos fluorocromos diferentes. Así se empleó isotiocianato de fluoresceína (FITC) como conjugado para los antiCD3 y Ficoeritrina (PE) para los antiCD4, antiCD8 y antiCD21. Los anticuerpos monoclonales también fueron conjugados con sus fluorocromos en el laboratorio del Dr. Peter F. Moore.

La FITC emite fluorescencia verde y la PE fluorescencia naranja, lo que permite diferenciar un anticuerpo monoclonal de otro cuando son empleados simultáneamente. De esta manera, se realizaron combinaciones de anticuerpos monoclonales de 2 en 2, estando presente en cada combinación siempre el anti-CD3.

Nº tubo	Monoclonales
1	CD3 / CD4
2	CD3 / CD8
3	CD3 / CD21

Tabla 3.10.2: Panel empleado en el estudio

De cada muestra sanguínea conservada en EDTA se preparaban tres tubos en los que se combinaba:

- 100 µl de sangre, 1 µl de conjugado CD3- FITC y 1 µl de conjugado CD4- PE
- 100 µl de sangre, 1 µl de conjugado CD3- FITC y 1 µl de conjugado CD8- PE
- 100 µl de sangre, 1 µl de conjugado CD3- FITC y 1 µl de conjugado CD21- PE

Estos tubos se dejaban incubar durante 10 minutos tras ser bien homogeneizados. Tras este tiempo la muestra se introducía en una estación semiautomática de preparación de muestras, Sistemas EPILS Multi Q-PREP de Coulter®, donde se realizaba el lisado eritrocitario, fijado y estabilización de la muestra de sangre entera con el fin de destruir los hematíes y trabajar únicamente con leucocitos en suspensión. El líquido de hemólisis empleado fue solución de lisis OptiLyse C® (Immunotech, Marsella, Francia). Tras este proceso, las muestras estaban listas para su procesamiento en el citómetro de flujo.

3.11. POBLACIONES LEUCOCITARIAS E INMUNOFENOTIPO

A continuación se describen cada una de las poblaciones linfocitarias estudiadas y su procedencia en relación con los marcadores empleados en el estudio citométrico de flujo:

- Los linfocitos B están representados por las células marcadas como CD3-CD21+ en la ventana de los linfocitos.
- Los linfocitos T, en nuestro estudio, están representados por las células marcadas como CD3+CD21- en la ventana de los linfocitos. Existen otras fórmulas descritas en la literatura para hallar el valor de linfocitos T. Así, Calvelli indica que el total de linfocitos T CD3+ es la media de los porcentajes obtenidos para las células CD3+ en todos los tubos en que se incluya el CD3 (Calvelli, 1993). Otros autores sugieren que el total de linfocitos T vendría dado también por la siguiente fórmula: la población de CD3+CD4+ más la población de CD3+CD8+ sería igual al total de células CD3+ más/menos un 10%, puesto que los linfocitos T CD4-CD8- representan un mínimo porcentaje (NCCSL, 1992). En nuestro estudio, también hemos realizado los cálculos aplicando estas fórmulas, comprobándose que se correlacionan estrechamente con los valores aplicados en el estudio.
- Los linfocitos T cooperadores están representados, en nuestro trabajo, por los CD3+CD4+.
- Los linfocitos T citotóxicos están representados, en nuestra investigación, por los CD3+CD8+.
- Los linfocitos T no cooperadores, ni citotóxicos o linfocitos T $\gamma\delta$, son los linfocitos CD3+, CD4-, CD8-. Esta población también se ha hallado siguiendo tres fórmulas

diferentes, no existiendo diferencias significativas en un intervalo de confianza del 99% entre los valores obtenidos en cada una de ellas. Las fórmulas aplicadas han sido:

- $\text{Linfocitos T } \gamma\delta = \text{Linfocitos T} - (\text{Linfocitos Th} + \text{Linfocitos Tc}).$
- $(\text{Linfocitos CD3+ menos Linfocitos (CD3+CD4+)} + \text{Linfocitos (CD3+CD8+)}).$
- $\text{Linfocitos T } \gamma\delta = \text{Linfocitos (CD3+CD8-)} - \text{Linfocitos Th}.$
- $(\text{Sustracción de los linfocitos CD3+CD8- menos los linfocitos CD3+CD4+}).$
- $\text{Linfocitos T } \gamma\delta = \text{Linfocitos (CD3+CD4-)} - \text{Linfocitos Tc}.$
- $(\text{Sustracción de los linfocitos CD3+CD4- menos los linfocitos CD3+CD8+}).$
- Los valores de linfocitos T $\gamma\delta$ expresados como porcentaje de linfocitos T se han obtenido por las siguientes fórmulas, obteniendo valores iguales en ambos casos:
 1. $(100 - (\%Th + \%Tc \text{ referidos a población T})) \times \% \text{linfocitos T} = \text{referido a población linfocitaria}.$
 2. $(\% \text{ linfocitos T } \gamma\delta / \% \text{ linfocitos T}) \times 100$
- Los linfocitos no T no B serían las células Natural Killer (McDonough y Moore, 2000) y corresponden a los linfocitos CD3-CD21- (Sakai *et al*, 2003).
- En nuestro estudio no existen CD3+CD21+ por incompatibilidad de definición.
- Los CD3-CD4+ serían neutrófilos o monocitos (Moore *et al*, 1992), pero no aparecerían en la ventana de las características morfológicas de los linfocitos, aunque puede aportar información indirecta sobre la pureza del análisis.

Una vez obtenidos los porcentajes de cada una de las estirpes linfocitarias determinadas inmunofenotípicamente, éstos se deben dar en relación al número total de glóbulos blancos presentes en la muestra. Estos porcentajes de estirpes linfocitarias se emplean para calcular el número absoluto de linfocitos pertenecientes a cada subpoblación por la fórmula: recuento de glóbulos blancos x porcentaje linfocitos x porcentaje estirpe linfocitaria = número de linfocitos inmunofenotípicamente iguales (Calvelli *et al*, 1993).

Así pues, y en resumen, dentro de la población leucocitaria se valoraron las siguientes poblaciones:

- Recuento diferencial de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos expresados en porcentaje de glóbulos blancos (tal y como hemos explicado en el apartado de hematología) y en valor absoluto.
- Recuento diferencial de subpoblaciones linfocitarias: linfocitos T, linfocitos B, linfocitos Natural Killer, expresado en números absolutos y en porcentaje de glóbulos blancos.
- Recuento diferencial de subpoblaciones de linfocitos T: linfocitos Th, linfocitos Tc, linfocitos T $\gamma\delta$ expresadas en valores absolutos, como porcentaje de glóbulos blancos y como porcentaje de linfocitos T.

3.12. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los resultados obtenidos fueron analizados mediante estudio estadístico básico, test de “t” de student, test de Wilcoxon, análisis de varianza (ANOVA), Test de Kruskal-Walis, cálculo de coeficientes de correlación y análisis de Regresión Lineal utilizando los programas estadísticos Statgraphics plus y Statistica 6.0. Los gráficos

derivados del estudio estadístico fueron realizados con el programa Statistica 6.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

Los resultados se han dividido en varias secciones. En primer lugar, se presentan los resultados de seroprevalencia de ehrlichiosis y leishmaniosis en los colectivos caninos estudiados. La realización de estos análisis serológicos fue necesaria para seleccionar los animales para nuestro estudio de acuerdo con los criterios señalados en el capítulo de materiales y métodos.

Una vez establecidos los dos grupos de estudio, Grupo 1 o grupo Control (formado 18 perros clínicamente sanos y seronegativos a ehrlichiosis y leishmaniosis) y Grupo 2 o grupo con Ehrlichiosis (formado por 38 perros afectados de forma natural de ehrlichiosis en fase subclínica), se procedió a la determinación de los valores hematológicos, las proteínas séricas y del inmunofenotipo de estos 56 animales. Los resultados de estos análisis se exponen en segundo lugar, presentando por un lado los resultados de los estadísticos básicos de todas las variables medidas en el grupo Control y en el grupo con Ehrlichiosis, y por otro lado se presentan los resultados del análisis de correlación entre los resultados del inmunofenotipo y el resto de las variables analíticas determinadas en cada uno de los grupos.

A continuación, se presentan los resultados del estudio comparativo entre la población sana y de la población afectada para cada una de las variables estudiadas

Por último, se recogen los resultados obtenidos en los estadísticos básicos de todas las variables medidas en el grupo de animales con Ehrlichiosis en los 5 tiempos de evaluación y se expone el análisis estadístico de la evolución post-terapéutica de estos mismos parámetros.

4.1 SEROPREVALENCIA DE EHRLICHIOSIS EN LOS COLECTIVOS ESTUDIADOS

Como se comentó en materiales y métodos, la selección de los animales objeto del estudio se realizó entre un total de 160 animales procedentes de dos protectoras de Valencia. En una de ellas se estudió un total de 117 perros y en la otra protectora 43 animales. Se realizó un estudio serológico de los niveles de anticuerpos frente a *Ehrlichia canis* y *Leishmania infantum*, cuyos resultados se detallan en la tabla siguiente:

LEISHMANIA	EHRLICHIA	NÚMERO PERROS	PORCENTAJE
NEGATIVO	NEGATIVO	39	24,37
NEGATIVO	POSITIVO	76	47,5
POSITIVO	NEGATIVO	10	6,25
POSITIVO	POSITIVO	35	21,87

TABLA 4.1.1.- Resultados de la serología frente a *Ehrlichia canis* y *Leishmania infantum* de perros procedentes de las protectoras valencianas muestreadas para la presente investigación.

El total de perros con título positivo de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* fue de 111, por lo que la prevalencia de ehrlichiosis en estas protectoras de Valencia es del 69,37% (con un título de anticuerpos antiehrlichia por encima de la dilución 1/80).

La prevalencia de leishmaniosis canina en estas colectividades es del 28,12%, encontrándose 45 animales con un título de anticuerpos antileishmania por encima de la dilución 1/100.

Se observa una concurrencia de ambas infecciones en el 21,87% de los perros de las colectividades (35 casos).

4.2 ESTADÍSTICOS BÁSICOS DEL GRUPO CONTROL

Los estadísticos básicos de los 18 perros que constituían el grupo Control se resumen en las tablas 4.2.1 a 4.2.5.

4.2.1 HEMATOLOGÍA: ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS.

ANIMALES CONTROL						
	HB (g/dl)	GR (10 ⁶ /μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Valor mínimo	15,20	5,85	42,30	66,70	21,90	29,40
Valor máximo	18,00	7,94	59,00	83,00	27,90	34,90
Media	16,77	6,77	52,31	77,64	24,82	31,63
Desviación estándar	0,90	0,50	4,27	4,08	1,46	1,37
Error estándar	0,23	0,13	1,04	1,05	0,39	0,37
Test distr. Normal	p = 0,18	p = 0,74	P = 0,68	p = 0,50	p = 0,71	p = 0,07

TABLA 4.2.1.-Estadísticos básicos de las variables hematológicas de la serie roja del grupo Control (HGB= hemoglobina; GR= glóbulos rojos; HTC= hematocrito; VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media)

4.2.2 PLAQUETAS

El recuento plaquetario en el grupo Control mostró un valor medio de 394.200 ± 24.489 plaquetas por microlitro, pudiendo ajustarse su distribución a una distribución normal ($p= 0,29$). El valor mínimo en el número de plaquetas en la población control del estudio fue de 238.000 plaquetas por microlitro y el máximo de 587.000 plaquetas por microlitro. La desviación estándar fue de 94.845.

4.2.3 PROTEÍNAS SÉRICAS

ANIMALES CONTROL				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	5,20	2,58	2,22	0,75
Valor máximo	8,60	4,51	4,72	1,45
Media	6,73	3,35	3,38	1,02
Desviación estándar	1,12	0,60	0,74	0,23
Error estándar	0,31	0,17	0,21	0,06
Test distr. Normal	p = 0,69	p = 0,28	p = 0,75	p = 0,67

TABLA 4.2.2.- Estadísticos básicos de las proteínas séricas en la población Control (PT = proteínas totales; A/G = cociente albúmina/globulinas)

4.2.4 RECUENTO LEUCOCITARIO E INMUNOFENOTIPO

GRUPO CONTROL	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS /μl	6000	16400	10155,60	2807,00	661,60	p = 0,65
NEUTRÓFILOS/μl	4964	10875	7037,67	1834,87	529,68	
EOSINÓFILOS/μl	0	1450	336,42	419,78	121,18	
MONOCITOS/μl	0	280	83,50	80,74	23,31	
LINFOCITOS/μl	1080	5180	2525,87	1034,08	258,52	p = 0,82
LINFOCITOS B/μl	144	1699	494,94	375,23	93,81	p = 0,02
LINFOCITOS T/μl	876	3155	1815,37	682,02	170,51	p = 0,50
LINFOCITOS NK/μl	54	341	177,56	78,33	19,58	p = 0,34
LINFOCITOS Th/μl	316	1277	832,25	278,13	69,53	p = 0,35
LINFOCITOS Tc/μl	193	1550	619,44	336,42	84,11	p = 0,10
LINFOCITOS T$\gamma$$\delta$/$\mu$l	0	995	364,12	275,30	68,82	p = 0,12

TABLA 4.2.3.- Estadísticos básicos de los valores absolutos de cada una de las poblaciones leucocitarias y del inmunofenotipo en el grupo de perros sanos del estudio.

GRUPO CONTROL	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estánd.	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	57,00	83,00	70,83	8,33	2,40	
EOSINÓFILOS %	0,00	10,00	3,00	3,16	0,91	
MONOCITOS %	0,00	2,00	0,75	0,62	0,18	
LINFOCITOS %	14,00	37,00	25,25	7,46	1,86	p = 0,56
LINFOCITOS B %	7,22	32,80	18,41	6,29	1,57	p = 0,38
LINFOCITOS T %	60,90	84,60	72,87	6,04	1,51	p = 0,75
LINFOCITOS NK %	3,78	13,70	7,30	2,63	0,67	p = 0,76
LINFOCITOS Th %	23,81	42,45	33,92	5,83	1,46	p = 0,69
LINFOCITOS Tc %	14,53	35,32	24,59	7,04	1,76	p = 0,53
LINFOCITOS T $\gamma\delta$ %	0,00	33,96	14,39	9,48	2,37	p = 0,14

TABLA 4.2.4.- Estadísticos básicos de los valores porcentuales de cada una de las poblaciones leucocitarias y del inmunofenotipo en el grupo de perros sanos del estudio.

Se halló el índice neutrófilos/linfocitos cuya media resultó ser $3,19 \pm 0,40$, siendo el valor mínimo 1,54, el máximo 5,36 y la desviación estándar 1,39, pudiendo ser ajustada la distribución a una normal ($p = 0,72$).

Los valores relativos de las subpoblaciones de los linfocitos T, también fueron calculados en relación con las células T, tal y como se reflejan en la tabla 4.2.5.

Porcentaje referido a linfocitos T en animales control						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Linfocitos Th	34,99	58,01	46,52	7,15	1,79	p = 0,34
Linfocitos Tc	18,94	50,53	33,89	9,88	2,47	P = 0,68
Linfocitos T $\gamma\delta$	0,00	43,71	19,61	12,59	3,15	P = 0,10

TABLA 4.2.5.- Estadísticos básicos de las subpoblaciones de linfocitos T expresados como porcentaje de células T, en la población del grupo Control del estudio.

Por último dentro de este apartado de resultados, se halló el índice de linfocitos TCD4⁺ / linfocitos TCD8⁺, siendo la media de este índice en la población control del estudio de $1,48 \pm 0,11$. El valor mínimo de este índice fue de 0,80 y el máximo de 2,40. La desviación estándar fue 0,45 y se comprobó que su distribución podía ser ajustada a una normal ($p = 0.48$).

Atendiendo a los resultados obtenidos en el grupo Control, se comprueba como la gran mayoría de las distribuciones de las variables estudiadas presentaban una distribución que podía ser ajustada a una distribución normal, para un 95% de márgenes de confianza.

Así, todos los valores del eritograma y de las proteínas séricas han permitido este ajuste. Además, tanto del número absoluto como relativo, de las distintos tipos de leucocitos e inmunofenotipos de linfocitos, con excepción de la distribución del número absoluto de linfocitos B, pueden ser ajustadas a una distribución normal. Las distribuciones del número absoluto y relativo de neutrófilos, eosinófilos y monocitos no pudieron ser evaluadas.

Realizando un análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en las distintas variables en cada uno de los perros del grupo Control, se puede comprobar como la práctica totalidad de los valores obtenidos quedan englobados dentro de los márgenes fisiológicos y sólo un número muy reducido de los mismos se sitúan ligeramente fuera de los mismos. Este es el caso de dos perros con una ligera hiperproteinemia, un perro con ligera eosinofilia y otro con una ligera linfocitosis.

4.3 ESTADÍSTICOS BÁSICOS DEL GRUPO CON EHRLICHIOSIS

Los resultados de las variables hematológicas, proteínas totales y del inmunofenotipo de los 38 perros infectados de manera natural con *Ehrlichia canis* obtenidos en el momento del diagnóstico se recogen en este apartado.

4.3.1. HEMATOLOGÍA: ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS

ANIMALES CON EHRLICHIOSIS						
	HB (g/dl)	GR (10⁶/μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Valor mínimo	11,70	4,57	35,00	64,60	14,50	19,10
Valor máximo	19,60	8,83	68,60	81,30	27,50	39,00
Media	15,74	6,92	52,06	75,22	22,94	30,61
Desviación estándar	1,73	0,93	7,76	4,34	2,40	3,66
Error estándar	0,29	0,16	1,29	0,72	0,40	0,61
Test distr. Normal	p = 0,62	p = 0,74	P = 0,90	p = 0,10	p = 0,81	p = 0,01

TABLA 4.3.1.- Estadísticos básicos de las variables hematológicas de la serie roja del grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico.

En el análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en cada uno de los perros afectados por Ehrlichiosis respecto a las variables del eritrograma, se comprueba que sólo un perro presentan una ligera anemia, siendo precisamente el caso que refleja los valores mínimos observados en la concentración de hemoglobina y el recuento de glóbulos rojos.

4.3.2 PLAQUETAS

El recuento plaquetario en el grupo de perros con Ehrlichiosis mostró un valor medio de $259,78 \pm 20,65$ plaquetas por microlitro, pudiendo ajustarse su distribución a una distribución normal ($p= 0,22$). El valor mínimo en el número de plaquetas en este grupo afectado del estudio fue de 64.000 plaquetas por microlitro y el máximo de 510.000 plaquetas por microlitro. La desviación estándar fue de 123.883.

De todos los perros con Ehrlichiosis, el 36% presentaban un recuento plaquetario por debajo de 200.000 trombocitos por microlitro, y sólo en dos de éstos la trombocitopenia se situó por debajo de las 100.000 plaquetas por microlitro.

4.3.3 PROTEÍNAS SÉRICAS

ANIMALES CON EHRLICHIOSIS				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	4,70	1,50	2,03	0,26
Valor máximo	13,00	4,07	9,70	1,33
Media	8,08	2,75	5,21	0,60
Desviación estándar	1,81	0,64	1,79	0,28
Error estándar	0,32	0,11	0,32	0,05
Test distr. Normal	p = 0,05	p = 0,59	p = 0,91	p = 0,01

TABLA 4.3.2.- Estadísticos básicos de los valores de proteínas séricas en perros del grupo con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico.

De todas las variables estudiadas en los perros con Ehrlichiosis, los parámetros relativos a las proteínas séricas son las que muestran unas mayores alteraciones. Así, la

disproteïnemia se comprueba en una gran mayoría de los casos (aproximadamente en el 75%), mostrando 13 animales un cociente Albúmina/Globulina por debajo de 0,5. Sólo en tres perros se recogieron unos valores de ligera hipoproteïnemia. Por el contrario fue predominante la hiperproteïnemia (en torno a un 40% de los casos), alcanzándose cifras de proteínas séricas totales superiores a 10 g/dl en 4 perros. Los valores observados en la concentración de albúmina y globulinas se encuentran en concordancia con los resultados anteriores, obteniéndose en torno a un 50% de los perros unas cifras de hiperglobulinemia (en 4 de ellos con cantidades de globulinas séricas superiores a los 7 g/dl) y en torno a un 40% de los animales hipoalbuminemia (en dos de ellos por debajo de 2g/dl de albúmina sérica).

4.3.4 RECUENTO LEUCOCITARIO E INMUNOFENOTIPO

A continuación se detallan los recuentos leucocitarios y del inmunofenotipo obtenidos en perros con ehrlichiosis en el momento del diagnóstico.

GRUPO CON EHRlichIOSIS	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS / μ l	7000	24200	11467,60	3801,10	624,90	p = 0,01
NEUTRÓFILOS/ μ l	3276	17908	6270,22	2790,38	493,27	p = 0,01
EOSINÓFILOS/ μ l	0	1624	301,50	378,61	66,93	p = 0,01
MONOCITOS/ μ l	0	609	114,41	153,95	27,21	p = 0,01
LINOCITOS/ μ l	803	10620	4615,24	2074,07	340,97	p = 0,55
LINOCITOS B/ μ l	100	1299	504,81	371,91	61,98	p < 0,01
LINOCITOS T/ μ l	435	9250	3923,61	1861,92	310,32	p = 0,86
LINOCITOS NK/ μ l	49	478	164,25	98,33	16,39	p = 0,01
LINOCITOS Th/ μ l	99	2708	1243,11	606,59	101,10	p = 0,73
LINOCITOS Tc/ μ l	141	7034	2153,47	1548,13	258,02	p = 0,07
LINOCITOS T γ δ / μ l	0	2275	518,47	572,53	95,42	p < 0,01

TABLA 4.3.3.- Estadísticos básicos de los valores absolutos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias de los animales infectados por *Ehrlichia canis* en el momento del diagnóstico.

GRUPO CON EHRlichiosis	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estánd.	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	30,00	88,00	55,22	12,47	2,21	p = 0,82
EOSINÓFILOS %	0,00	9,00	2,50	2,64	0,47	p < 0,01
MONOCITOS %	0,00	4,00	0,94	1,01	0,18	p = 0,01
LINFOCITOS %	11,00	68,00	39,76	13,25	2,15	p = 0,59
LINFOCITOS B %	2,39	31,10	12,06	8,32	1,39	p < 0,01
LINFOCITOS T %	54,20	95,10	81,83	10,26	1,71	p = 0,08
LINFOCITOS NK %	0,92	9,74	3,84	2,19	0,36	p = 0,12
LINFOCITOS Th %	9,06	52,10	27,05	9,51	1,58	p = 0,42
LINFOCITOS Tc %	12,9	79,70	42,63	19,51	3,25	p = 0,01
LINFOCITOS $\gamma\delta$ %	0,00	42,90	11,82	11,88	1,98	p < 0,01

TABLA 4.3.4.- Estadísticos básicos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias en el día previo al tratamiento de los animales infectados por *Ehrlichia canis* en el momento del diagnóstico.

En el momento del diagnóstico, el índice neutrófilos/linfocitos tuvo de media $1,49 \pm 0,14$. El valor mínimo fue 0,44, el máximo 3,76 y la desviación estándar 0,80, pudiendo ser ajustada la distribución a una normal ($p = 0,29$).

Respecto a las alteraciones observadas en la serie blanca en los perros con Ehrlichiosis, se observa como un porcentaje elevado de casos muestran cifras absolutas y relativas de linfocitosis (en torno a un 40%), mientras que sólo uno de ellos presentó una ligera linfopenia. No obstante, estas linfocitosis no fueron tan elevadas para llegar a producir cifras de leucocitosis; la que se observó sólo en tres casos, una de ellas provocada por el único caso que presentaba una ligera neutrofilia. Igualmente con excepción de un perro que presentaba una ligera eosinofilia, el resto de los casos presentaron unos recuentos de eosinófilos como de monocitos dentro de los márgenes fisiológicos.

La siguiente tabla muestra los estadísticos básicos del valor porcentual de las subpoblaciones T-linfocitarias referido a la población de linfocitos T del grupo de perros con Ehrlichiosis.

Porcentaje referido a linfocitos T en animales con Ehrlichiosis						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Linfocitos Th	10,38	65,63	33,87	13,41	2,23	p = 0,27
Linfocitos Tc	17,14	89,37	51,33	19,35	3,22	P = 0,71
Linfocitos T$\gamma\delta$	0,00	51,59	14,80	14,75	2,46	P < 0,01

TABLA 4.3.5.- Estadísticos básicos de las subpoblaciones de linfocitos T expresados como porcentaje de células T, en la población del grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico.

Por último dentro de este apartado de resultados, se halló el índice de linfocitos TCD4⁺ / linfocitos TCD8⁺, siendo la media de este índice en la población afectada con ehrlichiosis del estudio de 0,90 \pm 0,13. El valor mínimo de este índice fue de 0,12 y el máximo de 3,54. La desviación estándar fue 0,77 y se comprobó que su distribución no podía ser ajustada a una normal ($p < 0.01$).

En relación a la forma de distribución de las distintas variables en el grupo con Ehrlichiosis, se comprueba como una gran mayoría pueden ser ajustadas a una distribución normal (para un 95% de márgenes de confianza). No obstante, es conveniente destacar como algunas de las variables que en el grupo control se ajustaban a una distribución normal pierden esta forma de distribución, como consecuencia de las alteraciones biopatológicas que se producen en el curso de la Ehrlichiosis. Este es el caso de las proteínas séricas totales y el cociente Albúmina/Globulina, como de alguna variable de la serie leucocitaria y del inmunofenotipo.

4.4 CORRELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS

Nos pareció interesante conocer si existían asociaciones cuantitativas (dos a dos) entre los parámetros biopatológicos estudiados, en especial las que podrían presentarse con las subpoblaciones linfocitarias. Por ello se calcularon los coeficientes de correlación (r) entre las variables tanto en el grupo Control como en el grupo de perros con Ehrlichiosis, considerando el nivel de significación para un intervalo de confianza de al menos un 95% ($p < 0,05$), teniendo en cuenta el tamaño de cada una de las muestras.

Indudablemente muchas de las ausencias de asociación entre variables que esperábamos obtener, así como de las correlaciones significativas entre las distintas variables son obvias, debido a su propia naturaleza de vinculación (como por ejemplo parámetros de la serie roja y del proteinograma). No obstante queríamos comprobar que si la ausencia o la presencia de correlaciones significativas se presentaban en los dos grupos, o por el contrario la infección por *ehrlichia* podría modificar estas asociaciones.

En las siguientes tablas se recogen los resultados de los coeficientes de correlación (r) entre las distintas variables, en primer lugar los obtenidos en el grupo control destacando en negrilla aquellas que mostraban una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$), y en segundo lugar para el grupo de perros con Ehrlichiosis, destacando igualmente en negrilla las asociaciones significativas y en color rojo cuando se producía algún cambio en la significación estadística del coeficiente de correlación respecto al grupo Control.

4.4.1 CORRELACIONES ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES EN EL GRUPO CONTROL

Las siguientes tablas recogen los coeficientes de correlación entre los distintos parámetros biopatológicos analizados en el grupo Control (n = 18).

GR	GR						
HB	0,61	HB					
HTO	0,86	0,78	HTO				
VCM	-0,36	0,11	0,15	VCM			
HCM	-0,65	0,19	-0,33	0,67	HCM		
CHCM	-0,58	0,05	-0,58	0,09	0,80	CHCM	
PLT	-0,13	-0,16	-0,19	-0,59	-0,30	0,07	PLT

TABLA 4.4.1.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre diferentes variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa (p<0,05) entre las variables.

GR	0,09	0,41	0,24	0,19
HB	0,40	0,38	0,29	0,06
HTO	0,41	0,23	0,41	-0,15
VCM	0,65	0,40	0,69	-0,38
HCM	0,40	0,29	0,35	-0,17
CHCM	-0,01	0,20	-0,17	0,26
PLT	-0,15	0,20	-0,38	0,47
Variables	PT	ALB	GLOB	A/G

TABLA 4.4.2.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las diferentes variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) y las proteínas séricas del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa (p<0,05) entre las variables.

GB	0,55	0,32	0,12	-0,13	-0,31	-0,16	0,30
%Neu	-0,22	-0,05	-0,05	0,44	0,22	0,06	-0,37
Neu N	0,06	0,27	0,10	0,23	0,23	0,21	-0,11
%Eos	0,14	0,10	-0,09	-0,27	-0,14	0,21	0,28
Eos N	0,25	0,19	-0,03	-0,22	-0,13	0,20	0,21
%Mon	-0,12	-0,12	-0,29	-0,28	0,04	0,29	0,37
Mon N	-0,03	-0,04	-0,20	-0,19	0,02	0,24	0,36
%Linf	-0,06	0,14	-0,11	-0,26	-0,11	-0,14	0,17
Linf N	0,31	0,08	0,13	-0,26	-0,30	-0,24	0,36
Variables	GR	HB	HTC	VCM	HCM	CHCM	PLT

TABLA 4.4.3.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre variables del recuento leucocitario y otras variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) entre las variables.

% B	0,29	0,06	0,06	-0,39	-0,47	-0,27	0,56
Linf B	0,30	0,03	0,09	-0,33	-0,35	-0,20	0,52
% NK	-0,39	0,11	0,26	-0,04	0,58	0,52	-0,21
Linf NK	-0,18	0,13	-0,14	-0,32	0,34	0,30	0,09
% T	-0,12	0,14	0,14	0,48	0,34	0,08	-0,56
Linf T	0,32	0,12	0,18	-0,16	-0,25	-0,26	0,22
% Th	-0,21	0,25	-0,12	0,15	0,53	0,48	-0,05
Linf Th	0,32	0,27	0,15	-0,28	-0,10	-0,08	0,38
% Tc	-0,09	0,30	0,17	0,45	0,35	0,02	-0,56
Linf Tc	0,10	0,20	0,16	0,10	0,05	-0,11	-0,06
%T$\gamma\delta$	0,15	-0,32	0,03	-0,15	-0,44	-0,30	0,12
Linf T$\gamma\delta$	0,34	-0,19	0,11	-0,23	-0,55	-0,41	0,23
CD4/CD8	0,14	-0,01	-0,06	-0,29	-0,13	0,12	0,47
Variables	GR	HB	HTC	VCM	HCM	CHCM	PLT

TABLA 4.4.4.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre diferentes variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) y las variables de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

Entre las asociaciones encontradas entre los parámetros de la serie roja y el resto de las variables en el grupo Control, cabe destacar como los resultados reflejan una correlación estadísticamente significativa en relación directa entre el volumen corpuscular medio y las concentraciones de globulinas y de proteínas séricas totales, así como entre la concentración de hemoglobina media y los porcentajes de linfocitos NK y linfocitos Th en relación directa y con el número absoluto de linfocitos $T\gamma\delta$ en relación inversa.

En relación con el recuento plaquetario, el número de trombocitos se encuentra relacionado directamente tanto con el número absoluto como relativo de linfocitos B e inversamente al porcentaje de linfocitos T y Tc, en el grupo Control.

PT	PT			
ALB	0,79	ALB		
GLOB	0,87	0,38	GLOB	
A/G	-0,23	0,41	-0,67	A/G

TABLA 4.4.5.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables de proteínas séricas del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

GB	-0,20	-0,36	-0,01	-0,26
%Neu	0,52	0,12	0,69	-0,55
Neu N	0,07	-0,32	0,36	-0,60
%Eos	-0,21	-0,16	-0,20	0,06
Eos N	-0,20	-0,23	-0,12	-0,07
%Mon	-0,62	-0,39	-0,62	0,30
Mon N	-0,51	-0,35	-0,49	0,19
%Linf	-0,38	-0,04	-0,54	0,46
Linf N	-0,44	-0,22	-0,48	0,29
Variables	PT	ALB	GLOB	A/G

TABLA 4.4.6.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables de proteínas séricas y las de la fórmula leucocitaria del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

% B	-0,13	0,23	-0,39	0,61
Linf B	-0,24	0,01	-0,45	0,47
% NK	-0,03	-0,37	0,26	-0,60
Linf NK	-0,43	-0,52	-0,22	-0,25
% T	0,22	-0,08	0,40	-0,51
Linf T	-0,44	-0,28	-0,43	0,16
% Th	0,48	0,38	0,41	-0,20
Linf Th	-0,28	-0,07	-0,36	0,21
% Tc	0,10	-0,20	0,40	-0,63
Linf Tc	-0,32	-0,31	-0,22	-0,04
%T$\gamma\delta$	-0,31	-0,10	-0,38	0,34
Linf T$\gamma\delta$	-0,49	-0,26	-0,53	0,35
CD4/CD8	0,04	0,47	-0,06	0,37
Variables	PT	ALB	GLOB	A/G

TABLA 4.4.7.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables de proteínas séricas y las de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

En cuanto a la relación entre los parámetros de las proteínas séricas y el resto de la variables en el grupo Control, se comprueba como la concentración de globulinas séricas se encuentra correlacionada directamente con el porcentaje de neutrófilos e inversamente con los porcentajes de monocitos y linfocitos y con el número absoluto de linfocitos T $\gamma\delta$.

Igualmente cabe destacar como el cociente Albúmina/Globulina presenta una relación directa con el porcentaje de linfocitos B e inversa proporcional a los porcentajes de neutrófilos, linfocitos NK y linfocitos Tc.

GB	GB								
%Neu	-0,12	%Neu							
Neu N	0,86	0,38	NeuN						
%Eos	0,53	-0,15	0,44	%Eos					
Eos N	0,70	-0,11	0,59	0,97	EosN				
%Mon	0,63	-0,68	0,25	0,46	0,46	%Mon			
Mon N	0,76	-0,61	0,38	0,47	0,52	0,96	MonN		
%Linf	-0,08	-0,91	-0,58	-0,27	-0,30	0,43	0,36	% Linf	
Linf N	0,59	-0,85	-0,02	0,03	0,07	0,77	0,79	0,73	Linf N

TABLA 4.4.8.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables del recuento leucocitario del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

Como era de esperar, en el grupo Control el número absoluto de cualquier población leucocitaria se encuentra directamente relacionado con el recuento total de glóbulos blancos. Sin embargo en este grupo Control, las mayores asociaciones estadísticas entre las variables del recuento leucocitario se observan entre el porcentaje de neutrófilos y el número absoluto y relativo de linfocitos, en ambos casos en relación inversa. Del mismo modo destaca, en este caso en relación directa, unas correlaciones altamente significativas entre el número absoluto de linfocitos y los valores, absoluto y relativo, de monocitos.

% Linf	%Linf							
% B	0,48	% B						
% NK	-0,30	-0,49	% NK					
% T	-0,43	-0,91	0,14	% T				
% Th	-0,40	-0,52	0,51	0,43	% Th			
% Tc	-0,18	-0,25	0,55	0,11	0,12	% Tc		
% T $\gamma\delta$	0,11	-0,08	-0,64	0,29	-0,42	-0,75	% T $\gamma\delta$	
CD4/CD8	-0,05	-0,06	-0,28	0,17	0,39	-0,83	0,49	CD4/CD8

TABLA 4.4.9.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre los valores porcentuales de las variables linfocitarias del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

En relación a los recuentos porcentuales de las variables linfocitarias en el grupo Control se comprueba una relación inversa y altamente significativa entre los valores de linfocitos B y linfocitos T. Llama la atención como el porcentaje de linfocitos NK se muestra relacionado con los porcentajes de las tres subpoblaciones linfocitarias, de forma directa con los linfocitos Th y Tc, e inversamente con los linfocitos T $\gamma\delta$.

Por último, en relación con los porcentajes linfocitarios, cabe destacar como el cociente CD4/CD8 en la población sana se encuentra clara e inversamente relacionado con el porcentaje de linfocitos Tc y no con el porcentaje de linfocitos Th.

Linf	Linf							
Linf B	0,85	Linf B						
NK	0,54	0,28	NK					
Linf T	0,96	0,67	0,56	Linf T				
Linf Th	0,86	0,57	0,65	0,90	Linf Th			
Linf Tc	0,81	0,64	0,66	0,79	0,66	Linf Tc		
Linf T$\gamma\delta$	0,52	0,30	-0,08	0,60	0,41	0,06	Linf T$\gamma\delta$	
CD4/CD8	-0,12	-0,15	-0,32	-0,06	0,15	-0,60	-0,43	CD4/CD8

TABLA 4.4.10.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre los valores absolutos de las variables linfocitarias del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

Cuando se analizan las relaciones de los recuentos linfocitarios expresados en valores absolutos se comprueba un mayor número de relaciones estadísticamente significativas que en forma porcentual. En concreto el número total de linfocitos se encuentra directamente relacionado con todas y cada una las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, en relación directa.

Por otra parte llama la atención no sólo la relación directa entre el número de linfocitos T con el número de linfocitos Th y Tc como era de esperar, sino también con el número de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$. Además este número de linfocitos T se

encuentra asociado al número absoluto de otras poblaciones linfocitarias, linfocitos B y linfocitos NK.

Una vez más se comprueba que en la población sana el cociente CD4/CD8 se encuentra relacionado con el número total de linfocitos Tc y no con el de los linfocitos Th.

N° Linf	0,73	0,49	-0,26	-0,43	-0,43	-0,02	0,01
N°Linf B	0,64	0,84	-0,39	-0,76	-0,55	-0,11	-0,06
N°Linf NK	0,42	-0,06	0,64	-0,18	0,08	0,40	0,47
N°Linf T	0,68	0,26	-0,22	-0,18	-0,32	0,01	0,08
N°Linf Th	0,61	0,21	-0,02	-0,17	0,06	-0,02	-0,13
N°Linf Tc	0,55	0,25	0,06	-0,25	-0,32	0,54	-0,37
N°Linf T $\gamma\delta$	0,41	0,15	-0,62	0,04	-0,46	-0,62	0,78
Variables	%Linf	% B	% NK	% T	% Th	% Tc	% T $\gamma\delta$

TABLA 4.4.11.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre los valores porcentuales y absolutos de las variables linfocitarias del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

Cuando se analizan las posibles asociaciones cruzando los valores absolutos y relativos de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en el grupo Control, lo primero que llama la atención es que no existe una correlación entre los valores absolutos y relativos para todos y cada uno de los tipos de linfocitos. Concretamente ni en los linfocitos T y dentro de éstos, ni en los linfocitos Th, se comprueba una asociación directa entre sus valores absolutos y relativos, como sucede con el resto de variables linfocitarias.

Por otra parte se repiten las asociaciones inversas observadas entre los porcentajes de linfocitos T y linfocitos Th, con los linfocitos B anteriormente señaladas cuando éstos eran expresados igualmente en porcentajes, sólo que en este caso se comprueba igualmente con valores absolutos de linfocitos B.

GB	0,09	0,42	0,10	0,41	-0,12	0,61
%Neu	-0,48	-0,72	0,34	-0,47	0,42	-0,81
Neu N	-0,30	-0,07	0,61	0,32	0,11	-0,02
%Eos	0,03	0,08	0,35	0,25	-0,17	-0,03
Eos N	0,03	0,10	-0,45	0,33	-0,15	0,01
%Mon	0,26	0,64	-0,04	0,53	-0,30	0,72
Mon N	0,28	0,70	0,01	0,54	-0,34	0,72
Variables	%B	Linf B	% NK	Linf NK	% T	Linf T

TABLA 4.4.12.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables del recuento leucocitario (excluyendo los linfocitos) y las de población linfocitaria del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

GB	-0,06	0,61	0,16	0,49	-0,17	0,30	-0,02
%Neu	0,43	-0,81	0,26	-0,61	-0,25	-0,57	0,03
Neu N	0,05	-0,06	0,61	0,25	-0,51	-0,42	-0,44
%Eos	0,13	0,09	0,11	0,08	-0,43	-0,35	-0,15
Eos N	0,10	0,11	0,30	0,17	-0,50	-0,38	-0,23
%Mon	-0,39	0,65	-0,04	0,65	0,11	0,39	-0,21
Mon N	-0,39	0,65	0,12	0,74	-0,02	0,24	-0,33
Variables	% Th	Linf Th	%Tc	Linf Tc	%T$\gamma$$\delta$	Linf T$\gamma$$\delta$	CD4/CD8

TABLA 4.4.13.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables del recuento leucocitario (excluyendo los linfocitos) y las de subpoblaciones linfocitarias del grupo Control, en negrilla aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

Por último nos pareció interesante comprobar la posible existencia de asociaciones entre las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos con otras poblaciones leucocitarias. En este análisis comprobamos como en el grupo Control se establecen una serie de relaciones estadísticamente significativas entre las que destacamos una relación directa entre el recuento total de leucocitos y el número de linfocitos T, y dentro de éstos los linfocitos Th. Asociaciones semejantes suceden entre los valores de esta población de linfocitos T y de las subpoblaciones linfocitarias Th y Tc con el valor absoluto y relativos de monocitos.

Por otra parte el porcentaje de neutrófilos muestra una relación inversa tanto con los valores absolutos de linfocitos B y linfocitos T, como con los valores absolutos de las tres subpoblaciones linfocitarias Th, Tc y T $\gamma\delta$; y sin embargo el recuento absoluto de neutrófilos se encuentra exclusivamente asociado y en relación directa al porcentaje de linfocitos NK y linfocitos Tc.

4.4.2 CORRELACIONES ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES EN EL GRUPO DE PERROS CON EHRLICHIOSIS

Las siguientes tablas recogen los coeficientes de correlación entre los distintos parámetros biopatológicos analizados en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico (n = 38).

GR	GR						
HB	0,58	HB					
HTO	0,92	0,56	HTO				
VCM	0,05	0,11	0,43	VCM			
HCM	-0,65	0,24	-0,60	0,04	HCM		
CHCM	-0,59	0,16	-0,71	-0,47	0,86	CHCM	
PLT	0,15	0,02	0,05	-0,20	-0,18	-0,07	PLT

TABLA 4.4.14.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre diferentes variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) entre las variables y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

GR	-0,10	0,35	-0,18	0,19
HB	-0,03	0,19	-0,06	0,19
HTO	-0,18	0,41	-0,30	0,32
VCM	-0,26	0,27	-0,39	0,44
HCM	0,10	-0,23	0,17	-0,21
CHCM	0,20	-0,33	0,33	-0,39
PLT	0,37	0,42	0,22	0,04
Variables	PT	ALB	GLOB	A/G

TABLA 4.4.15.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las diferentes variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) y las proteínas séricas obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) entre las variables y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

GB	-0,14	-0,02	-0,15	-0,07	0,16	0,17	0,04
%Neu	-0,05	-0,26	0,02	0,19	-0,22	0,28	0,12
Neu N	-0,12	-0,11	-0,08	0,07	0,03	-0,01	0,02
%Eos	0,13	0,10	0,21	0,24	-0,11	-0,21	-0,03
Eos N	0,02	0,05	0,11	0,24	-0,01	-0,13	-0,03
%Mon	0,17	0,29	0,18	0,08	0,03	-0,02	0,05
Mon N	0,05	0,17	0,08	0,08	0,06	0,01	-0,02
%Linf	0,02	0,22	-0,03	0,29	0,22	0,28	-0,16
Linf N	-0,09	0,14	-0,14	-0,16	0,29	0,34	-0,05
Variables	GR	HB	HTC	VCM	HCM	CHCM	PLT

TABLA 4.4.16.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre variables del recuento leucocitario y otras variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) entre las variables y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

% B	-0,03	-0,08	0,08	0,29	-0,08	-0,23	0,09
Linf B	-0,01	0,07	0,10	0,29	-0,06	-0,10	0,09
% NK	0,11	-0,12	0,04	-0,17	-0,26	-0,15	0,32
Linf NK	0,11	0,07	-0,01	-0,30	-0,04	0,12	0,21
% T	0,06	0,09	-0,07	-0,31	0,06	0,22	-0,13
Linf T	-0,11	0,16	0,17	-0,17	0,34	0,39	-0,09
% Th	0,25	0,10	0,30	0,19	-0,21	-0,28	-0,23
Linf Th	0,01	0,14	0,04	0,06	0,15	0,11	-0,20
% Tc	-0,08	-0,07	-0,15	-0,18	0,08	0,18	-0,12
Linf Tc	-0,13	0,05	-0,19	-0,18	0,26	0,33	-0,11
%Tγδ	-0,02	0,09	-0,07	-0,16	0,07	0,13	0,29
Linf Tγδ	-0,02	0,18	-0,08	-0,16	0,18	0,23	0,24
CD4/CD8	0,15	0,03	0,17	0,09	-0,14	-0,18	-0,01
Variables	GR	HB	HTC	VCM	HCM	CHCM	PLT

TABLA 4.4.17.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre diferentes variables hematológicas (serie roja y recuento plaquetario) y las variables de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

Al estudiar las posibles relaciones entre los parámetros biopatológicos en el grupo de perros con Ehrlichiosis valorados en el momento del diagnóstico, lo primero que debemos señalar es que se comprueba un mayor número de correlaciones estadísticamente significativas que las obtenidas en el grupo Control.

Parte de estas correlaciones se deben a que el tamaño de la muestra del grupo de perros con Ehrlichiosis es mayor y por tanto se requiere un menor valor del coeficiente de correlación para alcanzar una relación significativa. Algunas de estas relaciones podían quedar sugeridas en el grupo Control si bien no podían ser admitidas como significativas.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que en el curso de la Ehrlichiosis se producen alteraciones en múltiples parámetros biopatológicos, era de esperar que en el grupo de

perros afectados del estudio, aunque en fase subclínica, estas alteraciones estuvieran presentes. Estas modificaciones en los distintos parámetros pueden conducir a establecer nuevas relaciones entre los mismos o pueden conducir a la pérdida de algunas relaciones observadas en la población sana del grupo Control.

Sin entrar en el estudio de los cambios que pueden presentar los distintos parámetros en el grupo de perros con Ehrlichiosis con respecto al grupo Control que será abordado más tarde, y que podrían explicar algunas de las correlaciones observadas, pensamos como sumamente interesante en un primer análisis de este apartado la constatación de relaciones altamente significativas entre distintas variables, ya que podría ser transformada una variable en indicador de otra. Este hecho, en nuestra opinión, puede ser muy útil cuando la valoración de una variable puede ser difícil y complicada, de tal forma que a partir de otra variable con la que se encuentra correlacionada y fácilmente evaluable podemos obtener información de la primera.

En este sentido, en el grupo de perros con Ehrlichiosis, entre las asociaciones encontradas entre los parámetros de la serie roja y el recuento plaquetario con el resto de las variables, cabe destacar las correlaciones estadísticamente significativas en relación directa entre la concentración de albúmina con el hematocrito y con el recuento plaquetario, y de este último con las proteínas séricas totales.

PT	PT			
ALB	0,39	ALB		
GLOB	0,90	0,05	GLOB	
A/G	-0,51	0,42	-0,79	A/G

TABLA 4.4.18.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables de proteínas séricas obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$).

GB	-0,07	0,09	-0,05	0,05
%Neu	-0,36	-0,08	-0,44	0,38
Neu N	-0,29	-0,01	-0,29	0,23
%Eos	-0,25	0,25	0,32	0,44
Eos N	-0,17	0,31	-0,26	0,40
%Mon	0,08	0,35	-0,04	0,23
Mon N	0,02	0,34	-0,08	0,24
%Linf	0,35	-0,04	0,46	-0,45
Linf N	0,24	0,04	0,31	-0,28
Variables	PT	ALB	GLOB	A/G

TABLA 4.4.19.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables de proteínas séricas y las de la fórmula leucocitaria obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

% B	-0,18	0,44	-0,43	0,64
Linf B	0,04	0,57	-0,20	0,39
% NK	-0,04	0,31	-0,25	0,45
Linf NK	0,22	0,30	0,19	-0,06
% T	0,06	-0,49	0,35	-0,60
Linf T	0,26	-0,06	0,37	-0,40
% Th	-0,27	0,06	-0,20	0,10
Linf Th	0,03	0,14	0,08	-0,08
% Tc	0,21	-0,22	0,34	-0,39
Linf Tc	0,32	-0,09	0,43	-0,43
%T$\gamma\delta$	-0,04	-0,11	-0,06	0,02
Linf T$\gamma\delta$	-0,01	-0,10	-0,01	-0,01
CD4/CD8	-0,23	0,01	-0,20	0,14
Variables	PT	ALB	GLOB	A/G

TABLA 4.4.20.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables de proteínas séricas y las de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

En cuanto a la relación entre los parámetros de las proteínas séricas y el resto de las variables en el grupo con ehrlichiosis, nos parecen como datos más relevantes la constatación de:

- que la concentración de globulinas séricas, se encuentra correlacionada directamente con el porcentaje y número de linfocitos T y el porcentaje y números de linfocitos Tc.
- que igualmente el cociente Albúmina/Globulina presenta una relación significativa con los linfocitos T y Tc, sólo que en este caso en relación inversa. Y que además dicho cociente se encuentra correlacionado directamente, al igual que la concentración de albúmina, con el porcentaje y número de linfocitos B.

GB	GB								
%Neu	-0,09	%Neu							
Neu N	0,85	0,42	NeuN						
%Eos	0,15	0,05	0,19	%Eos					
Eos N	0,55	0,08	0,54	0,86	EosN				
%Mon	0,18	0,34	0,33	0,46	0,54	%Mon			
Mon N	0,55	0,25	0,63	0,50	0,75	0,88	MonN		
%Linf	0,06	-0,97	-0,46	-0,28	-0,29	-0,50	0,41	% Linf	
Linf N	0,64	-0,75	0,15	-0,15	0,09	-0,26	0,01	0,77	Linf N

TABLA 4.4.21.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables del recuento leucocitario obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

Como era de esperar, y al igual que lo que se comprobó en el grupo Control, en los perros con Ehrlichiosis el número absoluto de cualquier población leucocitaria se encuentra directamente relacionado con el recuento total de glóbulos blancos. Sin embargo en este grupo 2, aunque se mantienen algunas de las relaciones observadas en el grupo control, aparecen otras nuevas y incluso otras desaparecen o cambian de signo, como

sucede la pérdida de correlaciones entre el número absoluto de linfocitos y los valores, absoluto y relativo, de monocitos, para establecerse unas nuevas relaciones directas entre el número absoluto de monocitos tanto con el número absoluto de neutrófilos como de eosinófilos.

% Linf	%Linf							
% B	-0,66	% B						
% NK	-0,53	0,31	% NK					
% T	0,64	-0,96	-0,44	% T				
% Th	-0,29	0,24	-0,01	-0,16	% Th			
% Tc	0,63	-0,69	-0,32	0,64	-0,52	% Tc		
% Tγδ	-0,23	0,10	0,17	-0,07	-0,12	-0,62	% Tγδ	
CD4/CD8	-0,56	0,45	0,19	-0,38	0,77	-0,77	0,28	CD4/CD8

TABLA 4.4.22.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre los valores porcentuales de las variables linfocitarias obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

En relación a los recuentos porcentuales de las variables linfocitarias en el grupo de perros con Ehrlichiosis se comprueba una relación inversa y altamente significativa entre los valores de linfocitos B y linfocitos T, al igual que sucedía con el grupo Control. Además en esta población afectada se comprueba como el porcentaje de linfocitos B igualmente está relacionado inversamente con el porcentaje de linfocitos Tc. Del mismo modo llama la atención como el porcentaje de linfocitos se encuentra relacionado con las tres poblaciones linfocitarias, mostrando una relación inversa con el porcentaje de linfocitos B y linfocitos NK, y directa con el porcentaje de linfocitos T, y dentro de este último con los linfocitos Tc. Esta última relación explica como igualmente el porcentaje de linfocitos se encuentra inversamente relacionado con el cociente CD4/CD8 en los perros con Ehrlichiosis.

Por último, en relación con los porcentajes linfocitarios, cabe destacar como el cociente CD4/CD8 en la población afectada se encuentra clara e inversamente relacionado con el porcentaje de linfocitos Tc como sucedía en el grupo Control, sólo que a diferencia con éste, en los perros con Ehrlichiosis también se comprueba una relación del cociente CD4/CD8 directa con el porcentaje de linfocitos Th y linfocitos B e inversa con el porcentaje de linfocitos T.

Linf	Linf							
Linf B	0,27	Linf B						
NK	0,47	0,19	NK					
Linf T	0,97	0,05	0,42	Linf T				
Linf Th	0,71	0,45	0,34	0,64	Linf Th			
Linf Tc	0,82	-0,17	0,29	0,89	0,37	Linf Tc		
Linf T$\gamma\delta$	0,20	0,13	0,25	0,19	0,02	-0,17	Linf T$\gamma\delta$	
CD4/CD8	-0,36	0,28	-0,16	-0,43	-0,08	-0,60	0,09	CD4/CD8

TABLA 4.4.23.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre los valores absolutos de las variables linfocitarias obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

Cuando se analizan las relaciones de los recuentos linfocitarios expresados en valores absolutos se comprueba como algunas de las relaciones estadísticamente significativas que se observaban en la población sana, han desaparecido en la población con Ehrlichiosis. En concreto algunas de las relaciones entre el número linfocitos B desaparecen, manteniéndose sólo su relación directa con el número de linfocitos Th. Igualmente las relaciones entre el número de linfocitos NK y el número de linfocitos Tc y entre el número de linfocitos T y el número de linfocitos T $\gamma\delta$ desaparecen.

Al considerar el número absoluto de linfocitos en lugar del porcentaje de todas las asociaciones señaladas entre el cociente CD4/CD8 y los distintos tipos de linfocitos, sólo

persisten aquellas que mostraban una relación inversa, es decir número de linfocitos, número de linfocitos T y número de linfocitos Tc.

N° Linf	0,77	-0,38	-0,38	0,37	-0,15	0,38	-0,16
N°Linf B	-0,14	0,70	-0,05	-0,64	0,26	-0,47	0,04
N°Linf NK	0,20	-0,10	0,51	0,01	-0,09	0,03	0,06
N°Linf T	0,82	-0,56	-0,41	0,55	-0,21	0,51	-0,16
N°Linf Th	0,41	-0,09	-0,32	0,14	0,51	-0,02	-0,25
N°Linf Tc	0,80	-0,62	-0,37	0,58	-0,38	0,80	-0,45
N°Linf T $\gamma\delta$	0,05	-0,03	0,01	0,07	-0,20	-0,44	0,90
Variables	%Linf	% B	% NK	% T	% Th	% Tc	% T $\gamma\delta$

TABLA 4.4.24.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre los valores porcentuales y absolutos de las variables linfocitarias obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

Cuando se analizan las posibles asociaciones cruzando los valores absolutos y relativos de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en el grupo de perros con Ehrlichiosis, lo primero que llama la atención es que si existe una correlación entre los valores absolutos y relativos para todos y cada uno de los tipos de linfocitos, hecho que no se producía en el grupo Control. Por otra parte en comparación con lo observado en la población sana aparecen numerosas y nuevas asociaciones y un número reducido dejan de producirse.

Por otra parte en la población afectada se repiten las asociaciones inversas observadas entre los porcentajes de linfocitos T y linfocitos Tc, con los linfocitos B anteriormente señaladas cuando éstos eran expresados igualmente en porcentajes, sólo que en este caso se comprueba igualmente con valores absolutos de linfocitos T y Tc.

También destaca como el número de linfocitos, el número de linfocitos T y el número de linfocitos Tc muestran unas relaciones inversas con los porcentajes de linfocitos

B y linfocitos NK. Además como dato más relevante de los resultados de la tabla 4.4.24 constatar como el número de linfocitos Tc se encuentra igualmente asociado con el resto de los porcentajes de linfocitos, directamente con el porcentaje de linfocitos y linfocitos T e inversamente con los porcentajes de las otras dos subpoblaciones linfocitarias Th y T $\gamma\delta$.

GB	0,18	0,65	-0,04	0,49	-0,15	0,50
%Neu	0,63	0,07	0,50	-0,25	-0,60	-0,77
Neu N	0,46	0,62	0,20	0,32	-0,40	0,01
%Eos	0,33	0,35	0,03	-0,09	-0,25	-0,28
Eos N	0,39	0,60	0,03	0,12	-0,31	-0,07
%Mon	0,49	0,34	0,18	-0,05	-0,45	-0,35
Mon N	0,47	0,55	0,13	0,15	-0,41	-0,13
Variables	%B	Linf B	% NK	Linf NK	% T	Linf T

TABLA 4.4.25.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables del recuento leucocitario (excluyendo los linfocitos) y las de población linfocitaria obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

GB	0,19	0,67	-0,14	0,26	-0,02	0,22	0,10
%Neu	0,19	-0,39	-0,49	-0,72	0,05	-0,21	0,40
Neu N	0,38	0,42	-0,40	-0,16	-0,06	0,05	0,40
%Eos	0,31	0,07	-0,48	-0,45	0,29	0,22	0,33
Eos N	0,39	0,39	-0,50	-0,33	0,20	0,25	0,38
%Mon	0,29	-0,02	-0,57	-0,47	0,25	0,13	0,47
Mon N	0,36	0,28	-0,51	-0,32	0,13	0,14	0,44
Variables	% Th	Linf Th	%Tc	Linf Tc	%T $\gamma\delta$	Linf T $\gamma\delta$	CD4/CD8

TABLA 4.4.26.- Asociaciones (coeficientes de correlación = r) entre las variables del recuento leucocitario (excluyendo los linfocitos) y las de subpoblaciones linfocitarias obtenidas en el grupo de perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico, en negrilla roja aquellos coeficientes que señalan una relación significativa ($p < 0,05$) y en color rojo aquellos coeficientes que expresan un cambio con los obtenidos en el grupo Control, bien por perder, alcanzar o cambiar de signo la relación estadísticamente significativa.

Por último, al igual que con el grupo Control, nos pareció interesante comprobar la posible existencia de asociaciones entre las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos con otras poblaciones leucocitarias en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

En este análisis comprobamos como en el grupo de perros afectados se establecen un mayor número de relaciones estadísticamente significativas entre las que destacamos:

- una relación directa entre el recuento total de leucocitos y el número de linfocitos B, linfocitos NK y linfocitos T, y dentro de éstos los linfocitos Th, pero no con el número de linfocitos Tc, ni con el número de linfocitos T $\gamma\delta$.
- unas asociaciones entre los valores relativos y absolutos de neutrófilos, eosinófilos y monocitos en relación directa con el cociente CD4/CD8 y el porcentaje y número de linfocitos B (salvo con el porcentaje de neutrófilos) y en relación inversa con el porcentaje y número de linfocitos Tc (salvo con el número de neutrófilos). Muchas de estas asociaciones no habían sido constatadas en el grupo Control, o bien de presentarse lo hacían con otro signo.

4.5 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DATOS OBTENIDOS DE POBLACIÓN SANA Y DE POBLACIÓN CANINA INFECTADA CON *Ehrlichia canis* ANTES DEL TRATAMIENTO

En este apartado se analizan comparativamente los valores obtenidos en el grupo Control para cada una de las variables frente a los valores obtenidos en el grupo de perros con Ehrlichiosis para la misma variable en el momento del diagnóstico. En aquellas variables cuyos resultados pueden ser ajustados a una distribución normal en ambos grupos se ha empleado la prueba estadística de “*t de student*” no pareada, mientras que cuando la variable no seguía una distribución Gaussiana, la comparación se ha realizado a través del test estadístico de *Wilcoxon* no pareado. El nivel de significación se consideró para un margen superior del 95% ($p < 0,05$) en ambas pruebas estadísticas.

4.5.1. HEMATOLOGÍA: ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS

De la tabla 4.5.1 a la 4.5.6, se detalla el análisis comparativo entre los valores obtenidos en perros sanos y perros con Ehrlichiosis para las variables correspondientes a la serie roja sanguínea:

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Hemoglobina g/dl	16,77	0,90	15,74	1,73
t = 2,18		p = 0,0344		

TABLA 4.5.1.- Resultados del Test de t-student en la comparación de la concentración de hemoglobina.

En el presente estudio, los valores de hemoglobina entre las poblaciones de perros sanos y de perros con Ehrlichiosis muestran diferencias estadísticamente significativas, observándose una disminución del valor de hemoglobina en los perros con Ehrlichiosis.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
GR $10^6 / \mu\text{l}$	6,77	0,50	6,92	0,93
t= -0,582		p = 0,5630		

TABLA 4.5.2.- Resultados del Test de t -student en la comparación del recuento de glóbulos rojos (GR).

El análisis comparativo del recuento de glóbulos rojos entre las poblaciones de perros sanos y perros con Ehrlichiosis del estudio, no muestra diferencias estadísticamente significativas.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Hematocrito %	52,31	4,28	52,06	7,76
T= 0,123		p = 0,9028		

TABLA 4.5.3.- Resultados del Test de t-student en la comparación del hematocrito.

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los valores del hematocrito de perros sanos y con Ehrlichiosis, observándose un valor medio similar del valor de hematocrito en los dos grupos.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
HCM pg	Media	DE	Media	DE
	24,82	1,46	22,94	2,40
t= 2,726		p = 0,0089		

TABLA 4.5.4.- Resultados del Test de t-student en la comparación de la hemoglobina corpuscular media (HCM).

El análisis comparativo de hemoglobina corpuscular media entre perros sanos y perros con Ehrlichiosis muestra diferencias estadísticamente significativas, observándose una disminución de la misma en los perros con Ehrlichiosis.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
VCM fl	Media	DE	Media	DE
	77,64	4,08	75,22	4,34
t= 1,482		p = 0,0716		

TABLA 4.5.5.- Resultados del Test de t-student en la comparación del volumen corpuscular medio (VCM).

Aunque se observa un valor del volumen corpuscular medio en los perros con Ehrlichiosis ligeramente inferior al obtenido en los perros sanos, esta diferencia no alcanza ser estadísticamente significativa.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
CHCM g/dl	Rango	Rango
	31,61	23,12
$z = 1,85$		$p = 0,0647$

TABLA 4.5.6.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de la concentración hemoglobina corpuscular media (CHCM).

Del mismo modo, aunque se observan diferencias en la concentración de hemoglobina corpuscular media entre los grupos de perros sanos y perros con Ehrlichiosis, comprobándose unos valores más bajos en los perros con Ehrlichiosis, estas diferencias sólo pueden considerarse estadísticamente como “casi” significativas.

4.5.2 PLAQUETAS

La siguiente tabla muestra el análisis comparativo del recuento plaquetario entre perros sanos y perros con Ehrlichiosis en el momento del diagnóstico.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
Plaquetas /μl	Media	DE	Media	DE
	394.200	94.846	259.778	123.883
$t = 3,760$		$p = 0,0005$		

TABLA 4.5.7.- Resultados del Test de t-student en la comparación del recuento de plaquetas.

Entre las poblaciones de perros sanos y con Ehrlichiosis de nuestro estudio, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el número de plaquetas circulantes, observándose una importante disminución del valor medio de las mismas en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

4.5.3 PROTEÍNAS SÉRICAS

El análisis comparativo de las proteínas séricas se muestra en las tablas 4.5.8 a 4.5.11.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Proteínas totales g/dl	Rango	Rango
	15,27	26,14
$z = -2,52$		$p = 0,0118$

TABLA 4.5.8.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de las proteínas séricas totales.

Se comprueba la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de proteínas totales en suero de perros sanos y perros con Ehrlichiosis. En esta investigación, los valores de proteínas totales se encuentran aumentados en los animales con Ehrlichiosis, lo que provoca en este grupo una pérdida de la distribución normal de esta variable con respecto al grupo control.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Albúmina g/dl	3,35	0,60	2,75	0,64
t= 2,916		p = 0,0056		

TABLA 4.5.9.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores séricos de albúmina.

En el presente estudio, existe una disminución estadísticamente significativa de los valores de albúmina sérica en los perros con Ehrlichiosis con respecto al grupo Control.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Globulinas g/dl	3,38	0,74	5,21	1,79
t= -3,548		p = 0,0010		

TABLA 4.5.10.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores séricos de globulinas.

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de globulinas séricas de perros sanos y con Ehrlichiosis; este valor se encuentra aumentado en los animales con Ehrlichiosis.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Cociente A/G	Rango	Rango
	35,38	17,97
z = 4,03		p = 0,0001

TABLA 4.5.11.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del cociente albúmina/globulina en suero.

En la presente investigación, se aprecia una disminución estadísticamente significativa de los valores del cociente albúmina/globulinas en perros con Ehrlichiosis, lo que provoca en este grupo una pérdida de la distribución normal de esta variable con respecto al grupo control.

4.5.4 RECUENTO LEUCOCITARIO Y POBLACIONES LEUCOCITARIAS

Las tablas 4.5.12 a la 4.5.21 muestran el análisis comparativo del número de leucocitos y de los valores de las poblaciones leucocitarias entre perros sanos y perros con Ehrlichiosis. Los valores relativos están referidos a población leucocitaria.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
GB x 10 ³ /μl	Rango	Rango
	24,14	29,88
z = -1,25		p = 0,21

TABLA 4.5.12.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del recuento leucocitario (GB).

En el presente estudio, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el valor medio del recuento de glóbulos blancos entre perros sanos y perros con Ehrlichiosis.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Neutrófilos %	Rango	Rango
	34,21	18,11
$z = 3,70$		$p = 0,0002$

TABLA 4.5.13.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del porcentaje de neutrófilos en sangre periférica.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Neutrófilos/ μ l	Rango	Rango
	27,75	20,53
$z = 1,66$		$p = 0,0969$

TABLA 4.5.14.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del número absoluto de neutrófilos circulantes.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio de neutrófilos circulantes entre perros sanos y perros con Ehrlichiosis; comprobándose una disminución de estos valores en los animales afectados con Ehrlichiosis. Sin embargo estas diferencias no alcanzar a ser estadísticamente significativas cuando se comparan los valores absolutos del número de neutrófilos circulantes en perros sanos y en perros con

Ehrlichiosis. No obstante estos resultados señalan un ligero descenso en el recuento absoluto de neutrófilos en la población afectada.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Eosinófilos %	Rango	Rango
	24,04	21,92
z= 0,49		p= 0,6259

TABLA 4.5.15.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del porcentaje de eosinófilos circulantes.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Eosinófilos /μl	Rango	Rango
	23,25	22,22
z= 0,24		p= 0,8125

TABLA 4.5.16.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores absolutos de eosinófilos circulantes.

Entre las poblaciones caninas estudiadas, sana y con ehrlichiosis, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ni en el número relativo ni absoluto de eosinófilos circulantes.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Monocitos %	Rango	Rango
	21,71	22,80
$z = -0,25$		$p = 0,8323$

TABLA 4.5.17.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores relativos de monocitos circulantes.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Monocitos / μ l	Rango	Rango
	22,42	22,53
$z = -0,03$		$p = 0,9790$

TABLA 4.5.18.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores absolutos de monocitos circulantes.

Tanto el valor relativo como absoluto de monocitos circulantes no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones caninas estudiadas.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Linfocitos %	25,35	7,46	39,76	13,25
t = -4,121		p = 0,0001		

TABLA 4.5.19.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores relativos de linfocitos circulantes.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Linfocitos / μ l	2525,87	1034,08	4615,24	2074,07
t = -3,815		p = 0,0004		

TABLA 4.5.20.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores absolutos de linfocitos circulantes.

En el presente estudio, se aprecia un notable incremento estadísticamente significativo tanto en el recuento porcentual como absoluto de linfocitos circulantes en los perros con Ehrlichiosis con respecto al grupo Control. Este aumento observado en los valores de linfocitos no modifica la distribución normal de esta variable, alcanzándose en torno a un 40% de los casos del grupo de perros con Ehrlichiosis cifras indicativas de linfocitosis. Este hecho provoca que el valor medio de linfocitos en términos absolutos y relativos sea más de 1,5 veces mayor en la población afectada con respecto a la población sana.

t-test	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Índice neutrófilos/linfocitos	3,19	1,39	1,49	0,80
t = 5,033		p < 0,0001		

TABLA 4.5.21.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores del índice neutrófilos/linfocitos.

Los menores valores en el número de neutrófilos junto con el marcado aumento del número de linfocitos observado en la población afectada por Ehrlichiosis, produce unas diferencias estadísticamente significativas entre el índice neutrófilos/linfocitos en perros con y sin Ehrlichiosis, observándose una marcada disminución del mismo en los perros afectados, superior al 50%, con respecto al grupo Control.

4.5.5 POBLACIONES LINFOCITARIAS

En la tablas 4.5.22 a 4.5.27 se analizan estadísticamente los valores de las poblaciones linfocitarias de perros sanos y perros con Ehrlichiosis en el tiempo cero de la investigación. Los valores relativos están referidos a porcentaje sobre población linfocitaria.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
% Linfocitos T	Rango	Rango
	16,84	30,79
z= -3,06		p= 0,0022

TABLA 4.5.22.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores porcentuales de linfocitos T circulantes.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
Linfocitos T/ μ l	Media	DE	Media	DE
	1815,37	682,02	3923,61	1861,92
t = -4,380		p = 0,0001		

TABLA 4.5.23.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores absolutos de linfocitos T circulantes.

Según los resultados de este estudio se comprueba como el aumento observado en los linfocitos circulantes en los perros afectados con Ehrlichiosis en principio obedece a un aumento altamente significativo de la población de linfocitos T, tanto expresada en valor relativo como absoluto.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
% Linfocitos B	Rango	Rango
	34,81	22,81
$z = 2,64$		$p = 0,0084$

TABLA 4.5.24.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores porcentuales de linfocitos B.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Linfocitos B / μl	Rango	Rango
	27,28	26,15
$z = 0,25$		$p = 0,8403$

TABLA 4.5.25.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores absolutos de linfocitos B.

Aunque se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el número relativo de linfocitos B entre ambas poblaciones de la investigación, cuando estos recuentos se expresan en valores absolutos las diferencias observadas son mínimas admitiendo que no existe variación entre las mismas.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
% NK	7,30	2,70	3,85	2,19
t = 4,887		p < 0,0001		

TABLA 4.5.26.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores relativos de linfocitos NK (Natural Killer).

Wilcoxon	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Rango		Rango	
NK / μ l	29,41		25,20	
z = 0,92		p = 0,3566		

TABLA 4.5.27.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores absolutos de linfocitos NK (Natural killer).

En lo que respecta a los valores de linfocitos NK sanguíneos, se comprueba una reducción claramente significativa en su porcentaje en perros con Ehrlichiosis respecto a la población del grupo Control. Sin embargo cuando se comparan los valores absolutos de linfocitos NK circulantes no se observan variaciones significativas entre las dos poblaciones objeto de estudio.

4.5.6. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Las tablas 4.5.28 a 4.5.34 reflejan los análisis comparativos de los valores de las subpoblaciones linfocitarias entre población sana y afectada de Ehrlichiosis.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
% Linfocitos Th	33,92	5,83	27,05	9,51
t = 2,67		p = 0,0103		

TABLA 4.5.28.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores relativos de linfocitos Th (referidos al total de linfocitos).

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Linfocitos Th/ μ l	832,25	278,12	1194,67	625,58
t = -2,58		p = 0,0128		

TABLA 4.5.29.- Resultados del Test t-student en la comparación de los valores absolutos de linfocitos Th circulantes.

Si bien el grupo Control presenta un porcentaje medio de linfocitos Th significativamente mayor que el del grupo de perros con ehrlichiosis, el análisis de los valores absolutos de linfocitos Th demuestra que es el grupo de perros con ehrlichiosis el que muestra un número medio superior y estadísticamente significativo de esta

subpoblación linfocitaria. Esta observación se explica porque los perros afectados con ehrlichiosis presentan un mayor número de linfocitos T circulantes con respecto a la población sana, como anteriormente ha sido señalado.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
% Linfocitos Tc	Rango	Rango
	17,00	32,72
$z = -3,01$		$p = 0,0026$

TABLA 4.5.30.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores porcentuales de linfocitos Tc (referidos al total de linfocitos).

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
Linfocitos Tc/ μ l	Rango	Rango
	13,31	32,16
$z = -4,38$		$p < 0,0001$

TABLA 4.5.31.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación de los valores absolutos de linfocitos Tc.

En el presente estudio, se observan diferencias estadísticamente significativas tanto en el porcentaje como en el número absoluto de linfocitos Tc entre los perros sanos y perros con Ehrlichiosis, existiendo unos marcados incrementos de los mismos en animales con Ehrlichiosis; alcanzándose un valor de más de 3 veces superior entre el promedio de linfocitos Tc de los perros con Ehrlichiosis con respecto al promedio de los perros sanos.

Estos resultados demuestran que el mayor número de linfocitos y linfocitos T observado en los perros con Ehrlichiosis viene motivado especialmente por un aumento de la subpoblación de linfocitos Tc.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
	Rango	Rango
% Linfocitos T $\gamma\delta$	31,09	24,46
z = 1,46		p = 0,1451

TABLA 4.5.32.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ (referidos al total de linfocitos).

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
	Rango	Rango
Linfocitos T $\gamma\delta$ / μ l	26,06	26,69
z = -0,14		p = 0,8896

TABLA 4.5.33.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del número de linfocitos T $\gamma\delta$.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ni en el porcentaje ni en el número de linfocitos T $\gamma\delta$ entre ambas poblaciones del estudio.

Wilcoxon test	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
	Rango	Rango
Índice CD4/CD8	37,78	21,49
z = 0,58		p = 0,0003

TABLA 4.5.34.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del índice linfocitario CD4/CD8.

Dado que la magnitud en el aumento del número de linfocitos Tc es netamente superior a la que se produce en los linfocitos Th en la población con Ehrlichiosis era lógico esperar que el índice linfocitario CD4/CD8 se encuentra claramente disminuido en la población con Ehrlichiosis con respecto al grupo Control del estudio. El descenso es tan marcado en algunos casos con Ehrlichiosis que provoca el desajuste de esta variable a la distribución normal, tal y como se muestra en la población sana. El promedio de este índice en el grupo de perros afectados sufre un descenso en torno al 60% respecto al promedio observado en el grupo Control.

En las siguientes tablas (4.5.35 - 4.5.37) se realiza un análisis comparativo, entre perros sanos y perros con ehrlichiosis, de los valores porcentuales de linfocitos Th, Tc y $T\gamma\delta$ referidos a la población de linfocitos T. Como era previsible el análisis estadístico arroja unos resultados similares a los obtenidos al comparar estas mismas variables cuando sus porcentajes eran referidos a la población linfocitaria.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Linfocitos Th % de Linf T	46,52	7,15	33,87	13,41
t = 3,54		p = 0,0009		

TABLA 4.5.35. Resultados del Test t-student en la comparación del porcentaje de linfocitos Th referido a linfocitos T.

t-student	Grupo Control		Grupo con Ehrlichiosis	
	Media	DE	Media	DE
Linfocitos Tc % de Linf T	33,89	9,88	51,33	19,35
t = -3,40		p = 0,0013		

TABLA 4.5.36.- Resultados del Test t-student en la comparación del porcentaje de linfocitos Tc referido a linfocitos T.

Wilcoxon	Grupo Control	Grupo con Ehrlichiosis
	Rango	Rango
Linfocitos T γ δ % de Linf T	32,00	24,06
z = 1,74		p = 0,0810

TABLA 4.5.37.- Resultados del Test de Wilcoxon en la comparación del porcentaje de linfocitos T γ δ referido a linfocitos T.

En el caso de los linfocitos Tc al ser expresados en función de los linfocitos T, la distribución de los valores en el grupo de perros con Ehrlichiosis se ajusta a una distribución normal, cosa que no sucedía cuando los porcentajes eran referidos respecto al total de linfocitos. Por ello se ha podido emplear en la comparación el test de *t-student*, en lugar del test de *Wilcoxon*. No obstante por ambos tests se obtienen resultados similares, ratificando un mayor promedio en el porcentaje de linfocitos Tc en la población afectada frente a la población sana.

4.6 EVOLUCIÓN POST-TERAPÉUTICA DE PARÁMETROS ESTUDIADOS EN PERROS CON EHRLICHIOSIS

A continuación se expone un análisis evolutivo de los valores de cada una de las variables, en cada uno de los tiempos de la investigación, en los perros con ehrlichiosis tras la administración del dipropionato de imidocarb, tal y como se indica en el capítulo de materiales y métodos.

En cada apartado en primer lugar se recogen los valores obtenidos para cada una de las variables en cada uno de los controles programados. A continuación se analizan la posible existencia de cambios en los valores de las variables tras el tratamiento con dipropionato de imidocarb. Para ello se comparan los valores obtenidos antes del tratamiento (T0) y en los diferentes tiempos post-tratamiento: 2 semanas (T1), 1 mes (T2), 3 meses (T3) y 6 meses después del tratamiento (T4), utilizando los tests estadísticos *ANOVA* y *Kruskal-Wallis*. Además, cuando los resultados de estos test reflejaron diferencias estadísticamente significativas (o próximas a la significación) se procedió a comparar los resultados entre los distintos controles (tomados dos a dos) mediante el test de t-student o el test de Wilcoxon, con el fin de precisar entre que tiempos se encontraban estas diferencias ($p < 0,05$).

En todos los gráficos se destaca con un asterisco rojo (*) aquellos valores que presentan diferencias significativas (al menos para una $p < 0,05$) respecto a los valores en el tiempo inicial (T0) del estudio, momento del diagnóstico.

4.6.1 HEMATOLOGÍA: ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS

En las siguientes tablas (tablas de la 4.6.1 a la 4.6.5) se detallan los resultados estadísticos básicos de las variables de la serie roja a lo largo de los diferentes tiempos del estudio

ANIMALES CON EHRLICHIOSIS T0						
	HB (g/dl)	GR (10⁶/μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Valor mínimo	11,70	4,57	35,00	64,60	14,50	19,10
Valor máximo	19,60	8,83	68,60	81,30	27,50	39,00
Media	15,74	6,92	52,06	75,22	22,94	30,61
Desviación estándar	1,73	0,93	7,76	4,34	2,40	3,66
Error estándar	0,29	0,16	1,29	0,72	0,40	0,61
Test distr. Normal	p = 0,62	P = 0,74	P = 0,90	p = 0,10	p = 0,81	p = 0,01

TABLA 4.6.1.- Estadísticos básicos de las variables del eritrograma e índices volumétricos del grupo de perros con Ehrlichiosis antes de la aplicación del tratamiento.

ANIMALES CON EHRLICHIOSIS T1						
	HB (g/dl)	GR (10⁶/μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Valor mínimo	9,10	3,95	31,70	65,10	21,00	28,70
Valor máximo	20,90	8,93	60,60	81,20	26,50	36,70
Media	15,49	6,44	47,50	74,17	24,13	32,66
Desviación estándar	2,89	1,19	7,54	5,03	1,30	2,40
Error estándar	0,72	0,30	1,88	1,22	0,31	0,58
Test distr. Normal	P = 0,78	P = 0,75	P = 0,62	p = 0,37	p = 0,63	p = 0,68

TABLA 4.6.2.- Estadísticos básicos de las variables del eritrograma e índices eritrocitarios del grupo de perros con Ehrlichiosis obtenidos a las dos semanas tras la aplicación del tratamiento.

ANIMALES CON EHRlichiosis T2						
	HB (g/dl)	GR (10⁶/μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Valor mínimo	13,30	5,18	37,30	62,60	19,20	28,10
Valor máximo	19,60	11,02	59,40	87,50	30,10	37,00
Media	16,31	7,23	49,34	72,57	23,61	32,54
Desviación estándar	1,84	1,48	5,99	5,54	2,32	2,40
Error estándar	0,35	0,28	1,20	1,09	0,45	0,47
Test distr. Normal	P = 0,78	p = 0,32	P = 0,28	p = 0,66	p = 0,22	p = 0,93

TABLA 4.6.3.- Estadísticos básicos de las variables del eritrograma e índices eritrocitarios del grupo de perros con Ehrlichiosis obtenidos en el primer mes post-tratamiento.

ANIMALES CON EHRlichiosis T3						
	HB (g/dl)	GR (10⁶/μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Tamaño muestral	19	19	19	19	19	19
Valor mínimo	13,40	5,48	37,90	65,50	20,20	29,80
Valor máximo	19,80	9,30	62,90	78,30	26,40	37,90
Media	16,36	6,84	49,47	72,43	24,00	33,23
Desviación estándar	1,75	0,89	6,01	3,89	1,39	2,54
Error estándar	0,40	0,20	1,38	0,89	0,32	0,58
Test distr. Normal	P = 0,54	p = 0,83	P = 0,69	p = 0,77	p = 0,70	p = 0,28

TABLA 4.6.4.- Estadísticos básicos de las variables del eritrograma e índices eritrocitarios del grupo de perros con Ehrlichiosis el día 90 del estudio.

ANIMALES CON EHRLICHIOSIS T4						
	HB (g/dl)	GR (10 ⁶ /μl)	HTC (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
Tamaño muestral	26	26	26	26	26	26
Valor mínimo	12,20	5,55	40,30	67,80	20,80	29,20
Valor máximo	20,40	8,87	61,70	80,80	26,10	36,30
Media	16,85	6,95	50,48	72,36	24,20	33,48
Desviación estándar	1,88	0,76	5,59	3,13	1,31	1,97
Error estándar	0,37	0,15	1,10	0,61	0,26	0,39
Test distr. Normal	P = 0,16	P = 0,28	P = 0,65	p = 0,69	p = 0,75	p = 0,19

TABLA 4.6.5.- Estadísticos básicos de las variables del eritrograma e índices eritrocitarios del grupo de perros con Ehrlichiosis a los 6 meses post-tratamiento.

A continuación se detallan gráficamente la evolución de las variables del eritrograma a lo largo de los diferentes tiempos del estudio, incluyendo en el pie de gráfico los resultados de los tests estadísticos aplicados (gráficos del 4.6.1 al 4.6.6).

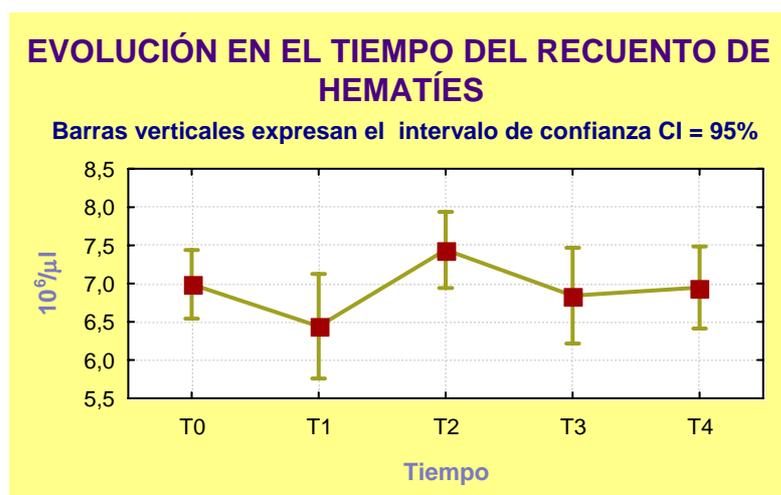


Gráfico 4.6.1.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de hematíes en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: F = 1,37 p = 0,25. Test Kruskal-Walis: Ht = 3,44 p = 0,49.

No se aprecian diferencias significativas en el recuento de hematíes en perros con Ehrlichiosis en los distintos tiempos del estudio.

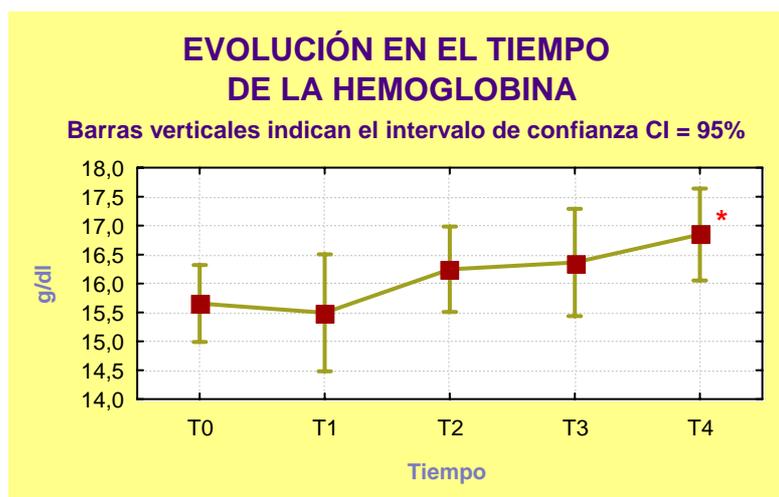


Gráfico 4.6.2.- Evolución a lo largo del tiempo del valor de hemoglobina en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,75$ $p = 0,14$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 5,65$ $p = 0,23$.

Aunque el ANOVA no aprecia diferencias estadísticamente significativas en los valores de hemoglobina a lo largo del tiempo, se observa un ligero incremento progresivo de este parámetro a partir del tiempo T1, comprobándose un valor medio de hemoglobina más alto en último control T4 (a partir de los 4 meses de tratamiento), que difiere estadísticamente con el valor inicial T0 (Test de t student: $t = 2,40$; $p = 0,02$ y Test Wilcoxon: $z = 2,08$; $p = 0,04$).

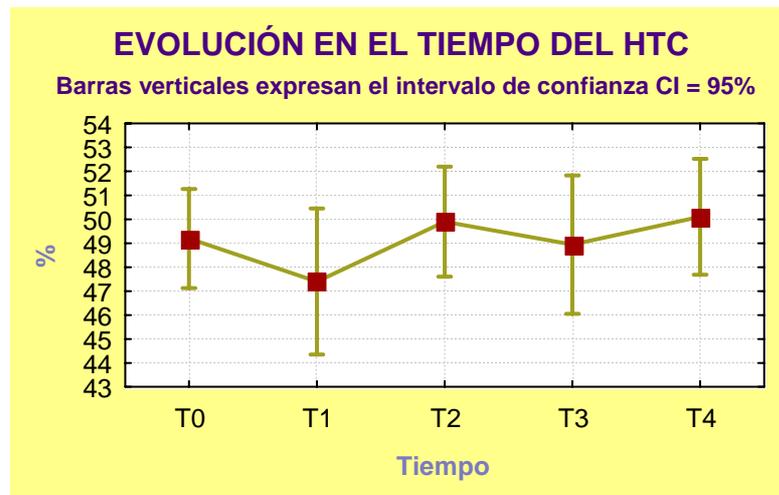


Gráfico 4.6.3.- Evolución a lo largo del tiempo del valor del hematocrito en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,51$ $p = 0,20$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 4,65$ $p = 0,32$.

Aunque los valores medios del hematocrito presentan ligeras oscilaciones, no se observan variaciones estadísticamente significativas a lo largo del tiempo del estudio en perros con ehrlichiosis.

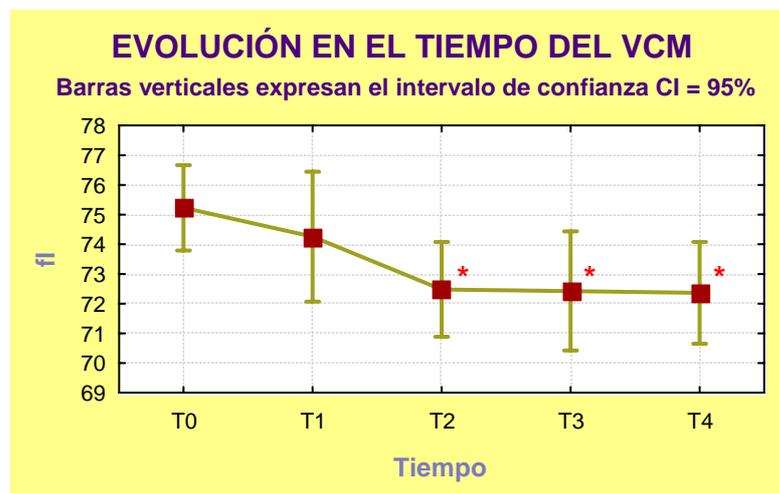


Gráfico 4.6.4.- Evolución a lo largo del tiempo del VCM en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 2,44$ $p = 0,05$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 10,47$ $p = 0,03$.

Se observa una disminución estadísticamente significativa en los valores del volumen corpuscular medio (VCM) a partir del tiempo T2 con respecto al valor inicial T0 (Test de t student: $t = 2,11$; $p = 0,04$ y Test Wilcoxon: $z = 2,10$; $p = 0,04$), para mantenerse prácticamente constante en los tiempos T3 y T4.

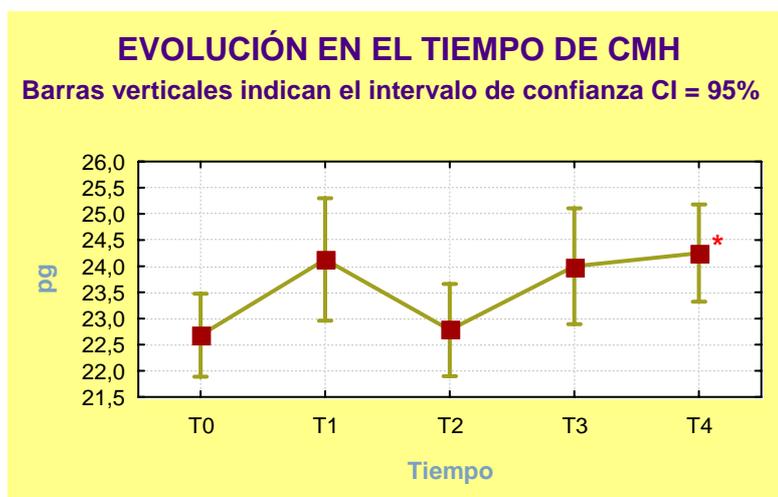


Gráfico 4.6.5.- Evolución a lo largo del tiempo de la CMH en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 2,16$ $p = 0,08$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 8,01$ $p = 0,09$.

En relación a la concentración media de hemoglobina (CMH), con respecto al valor inicial (T0) se produce un aumento estadísticamente casi significativo en el tiempo T1 (Test t student: $t = 1,90$; $p = 0,06$ y Test Wilcoxon: $z = 2,05$; $p = 0,04$), para mantenerse a partir de este momento con unos valores con ligeras oscilaciones sin que se obtengan diferencias significativas entre ellos (T1, T2, T3 y T4) y alcanzando una diferencia estadísticamente significativa en el T4 con respecto al valor inicial T0 (Test t student: $t = 2,45$; $p = 0,02$ y Test Wilcoxon: $z = 2,47$; $p = 0,01$).

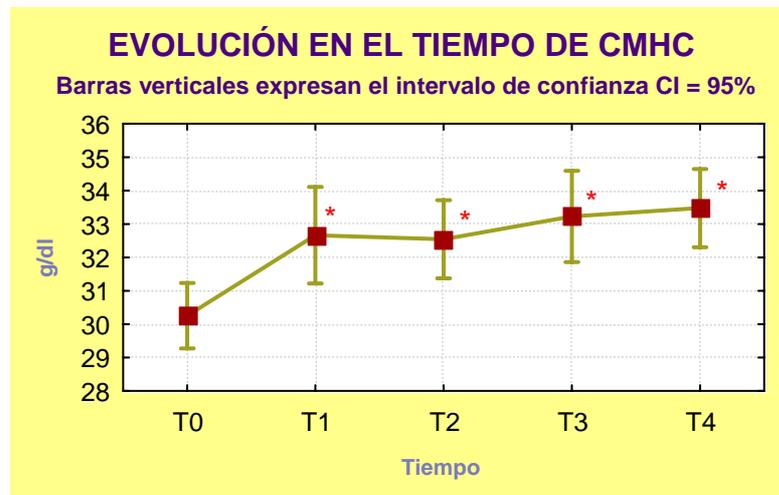


Gráfico 4.6.6.- Evolución a lo largo del tiempo de la CMHC en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 5,13$ $p = 0,001$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 19,06$ $p < 0,001$.

Los valores de la concentración media de hemoglobina corpuscular (CMCH) sufren una evolución similar al parámetro CMH, observándose un incremento estadísticamente significativo de los valores de CMCH a partir del tiempo T1 de la investigación con respecto al valor inicial T0 (Test t student: $t = 2,01$; $p = 0,04$ y Test de Wilcoxon: $z = 2,41$; $p = 0,02$). A partir de este momento los valores medios de CMCH permanecen prácticamente constantes y se mantienen las diferencias significativas con respecto al tiempo T0.

4.6.2 PLAQUETAS

En el siguiente tabla se recogen los valores plaquetarios en perros con ehrlichiosis a lo largo del tiempo.

PLAQUETAS $10^3 / \mu\text{l}$						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. Normal
Ehrlichiosis T0	64	510	259,78	123,88	20,65	0,22
Ehrlichiosis T1	135	474	246,82	89,47	21,70	0,59
Ehrlichiosis T2	43	571	242,75	102,44	19,36	0,14
Ehrlichiosis T3	37	384	224,84	88,15	20,22	0,24
Ehrlichiosis T4	33	472	227,79	109,24	20,64	0,98

TABLA 4.6.6.- Estadísticos básicos de los valores plaquetarios en el grupo de perros con Ehrlichiosis del estudio en función de los periodos de control.

En el siguiente gráfico se representa la evolución de los valores plaquetarios en perros con ehrlichiosis a lo largo del tiempo.

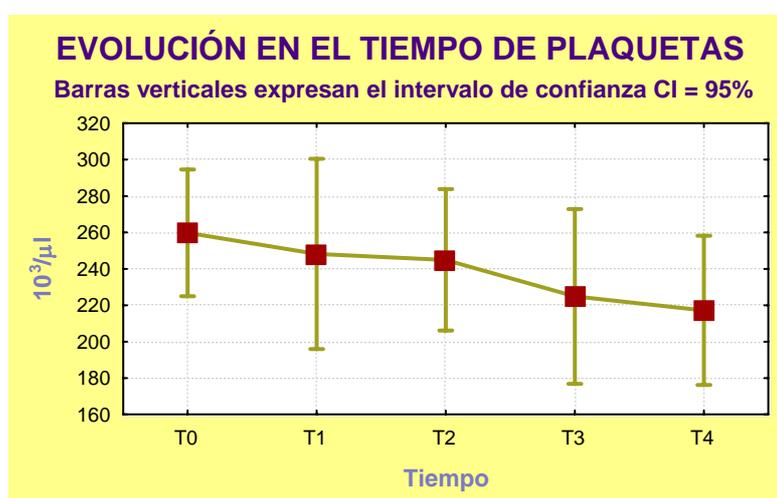


Gráfico 4.6.7.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de plaquetas en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,50$ $p = 0,73$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 0,58$ $p = 0,96$.

El análisis estadístico revela que no existen diferencias significativas entre los recuentos medios plaquetarios en los diferentes tiempos de control tras el tratamiento con respecto al valor inicial T0, ni entre ellos.

4.6.3 PROTEÍNAS SÉRICAS

En las siguientes tablas (tablas de la 4.6.7 a la 4.6.11) se recogen los resultados de las proteínas totales, albúmina, globulinas e índice albúmina/globulinas séricas obtenidos en los perros con ehrlichiosis antes y después del tratamiento, en cada uno de los controles efectuados.

ANIMALES CON EHRlichIOSIS T0				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	4,70	1,50	2,03	0,26
Valor máximo	13,00	4,07	9,70	1,33
Media	8,08	2,75	5,21	0,60
Desviación estándar	1,81	0,64	1,79	0,28
Error estándar	0,32	0,11	0,32	0,05
Test distr. Normal	p = 0,05	p = 0,59	p = 0,91	p = 0,01

TABLA 4.6.7.- Estadísticos básicos de los valores de proteínas séricas en perros del Grupo 2 en el tiempo previo al tratamiento (T0).

ANIMALES CON EHRlichiosis T1				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	6,80	1,85	2,44	0,23
Valor máximo	10,90	3,42	8,47	1,40
Media	9,15	2,81	6,18	0,51
Desviación estándar	1,25	0,43	1,64	0,27
Error estándar	0,32	0,11	0,42	0,07
Test distr. Normal	p = 0,50	p = 0,80	p = 0,80	p < 0,01

TABLA 4.6.8.- Estadísticos básicos de los valores de proteínas séricas en perros del Grupo 2 en el tiempo T1 del estudio.

ANIMALES CON EHRlichiosis T2				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	4,37	1,39	1,69	0,28
Valor máximo	11,46	3,78	7,69	1,64
Media	7,58	2,78	4,80	0,67
Desviación estándar	2,07	0,64	1,75	0,33
Error estándar	0,40	0,12	0,34	0,06
Test distr. Normal	p = 0,34	p = 0,54	p = 0,38	p < 0,01

TABLA 4.6.9.- Estadísticos básicos de los valores de proteínas séricas en perros del Grupo 2 en el tiempo T2 de la investigación.

ANIMALES CON EHRlichiosis T3				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	4,30	1,60	2,30	0,29
Valor máximo	7,80	3,41	5,77	1,27
Media	6,77	2,29	4,36	0,57
Desviación estándar	0,87	0,49	0,98	0,26
Error estándar	0,20	0,11	0,22	0,06
Test distr. Normal	p = 0,65	p = 0,90	p = 0,46	p = 0,04

TABLA 4.6.10.- Estadísticos básicos de los valores de proteínas séricas en perros del Grupo 2 a los 90 días del tratamiento (T3).

ANIMALES CON EHRlichiosis T4				
	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Globulina (g/dl)	A/G
Valor mínimo	6,50	2,00	3,72	0,27
Valor máximo	11,00	4,27	8,00	0,99
Media	8,72	2,86	5,86	0,51
Desviación estándar	1,30	0,61	1,24	0,17
Error estándar	0,25	0,12	0,24	0,03
Test distr. Normal	p = 0,91	P = 0,21	p = 0,88	p = 0,67

TABLA 4.6.11.- Estadísticos básicos de los valores de proteínas séricas en perros del Grupo 2 en el tiempo T4 del estudio.

Los gráficos 4.6.8 al 4.6.11 nos muestran la evolución en el tiempo de las siguientes variables: proteínas totales, albúmina, globulinas e índice albúmina / globulinas en suero de perros con Ehrlichiosis antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb.

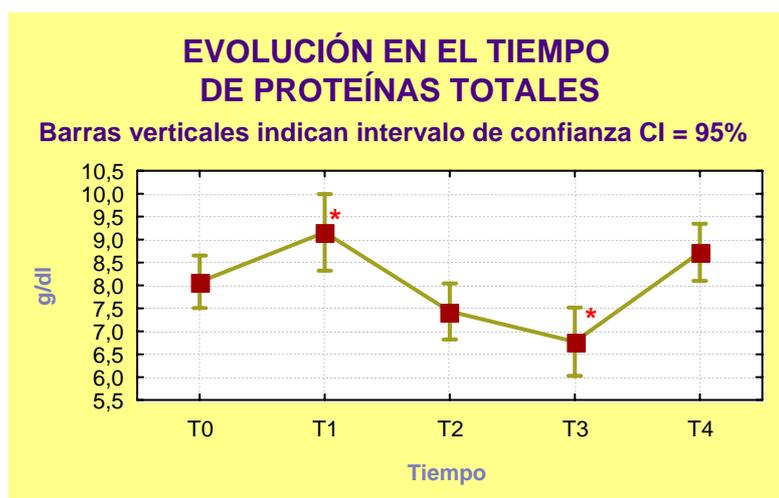


Gráfico 4.6.8.- Evolución a lo largo del tiempo de proteínas séricas totales en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 6,61$ $p < 0,01$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 26,76$ $p < 0,001$.

Tras producirse un incremento significativo de la concentración media de proteínas séricas totales en el tiempo T1 del estudio con respecto al valor inicial T0 (Test t student: $t = 2,07$; $p = 0,04$ y Test Wilcoxon $z = 2,56$; $p = 0,01$), comienza un descenso de las mismas claramente significativo en el tiempo T2 y T3, para volver a presentar un incremento en su concentración en el tiempo T4 en relación con el control anterior T3 (Test t student: $t = 5,68$; $p < 0,001$ y Test Wilcoxon: $z = 4,47$; $p < 0,001$).

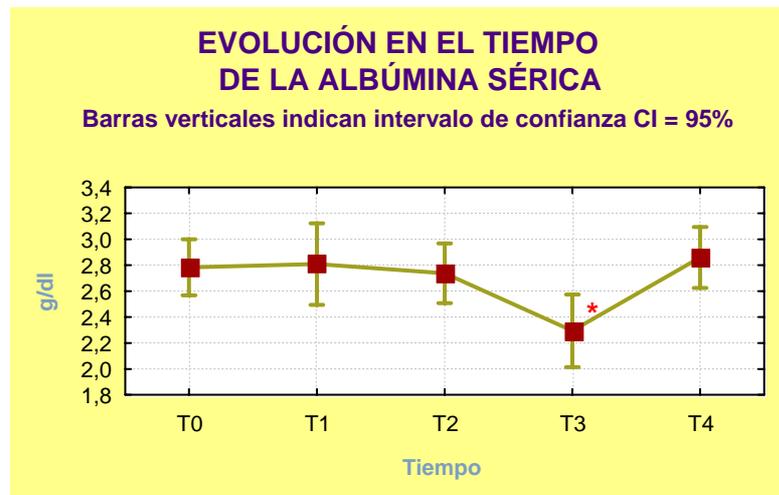


Gráfico 4.6.9.- Evolución a lo largo del tiempo de la albúmina sérica en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 3,04$ $p = 0,02$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 11,58$ $p = 0,02$.

Los resultados del estudio demuestran que el valor medio de la albúmina sérica se mantienen constantes en los diferentes tiempos de la investigación; con excepción del valor obtenido en el tiempo T3 que refleja una fluctuación estadísticamente significativa a la baja en relación con el momento inicial del estudio T0 (Test t student: $t = 2,69$; $p = 0,01$ y Test Wilcoxon: $z = 2,42$; $p = 0,02$) y con el resto de los tiempos de control.

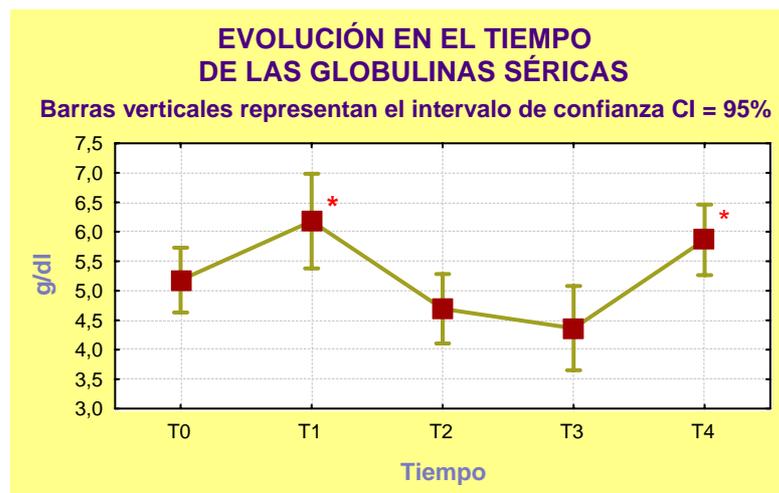


Gráfico 4.6.10.- Evolución a lo largo del tiempo de la concentración de globulinas séricas en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 4,65$ $p = 0,002$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 18,72$ $p < 0,001$.

La evolución de la concentración media de las globulinas séricas discurre en paralelo a la observada en las proteínas séricas totales. Tras producirse un incremento casi significativo de la concentración media de globulinas séricas en el tiempo T1 del estudio con respecto al valor inicial T0 (Test t student: $t = 1,78$; $p = 0,08$ y Test Wilcoxon: $z = 2,06$; $p = 0,04$), comienza un descenso de las mismas claramente significativo en el tiempo T2 y T3, para volver a presentar un incremento en su concentración en el tiempo T4 en relación con el control anterior T3 (Test t student: $t = 4,38$; $p < 0,001$ y Test Wilcoxon: $z = 3,64$; $p < 0,001$).

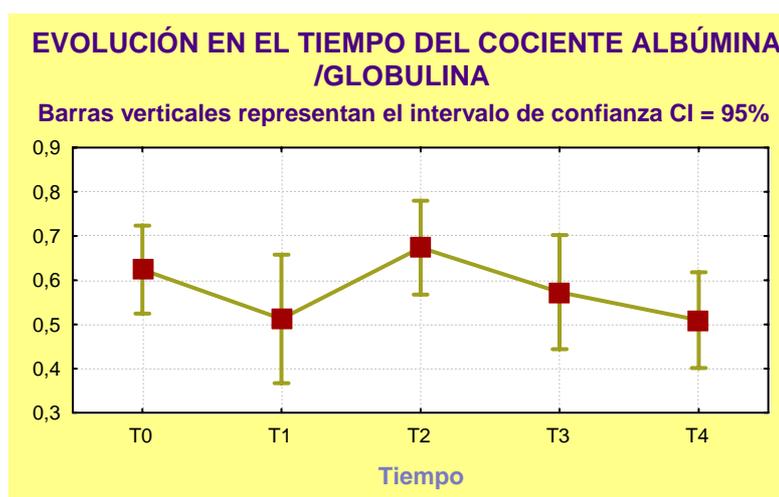


Gráfico 4.6.11.- Evolución a lo largo del tiempo del cociente albúmina / globulina sérica en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,43$ $p = 0,23$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 5,4$ $p = 0,24$.

Aunque se observan ligeras oscilaciones, relacionadas con los cambios en la concentración de albúmina y de las globulinas séricas anteriormente señalados, los valores medios del cociente albúmina/globulina sérica no presentan variaciones significativas en los diferentes tiempos del estudio.

4.6.4 RECUESTO LEUCOCITARIO E INMUNOFENOTIPO

En las tablas siguientes se recogen los resultados de distintas variables relativas a los recuentos leucocitarios y del inmunofenotipo en los distintos tiempo de estudio del grupo de perros con ehrlichiosis, primero expresados en valores absolutos (tablas 4.6.12- 4.6.16) y a continuación en valores relativos (tablas 4.6.17-4.6.21)

T0	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS / μ l	7000	24200	11467,60	3801,10	624,90	p = 0,01
NEUTRÓFILOS/ μ l	3276	17908	6270,22	2790,38	493,27	p = 0,01
EOSINÓFILOS/ μ l	0	1624	301,50	378,61	66,93	p = 0,01
MONOCITOS/ μ l	0	609	114,41	153,95	27,21	p = 0,01
LINFOCITOS/ μ l	803	10620	4615,24	2074,07	340,97	p = 0,55
LINFOCITOS B/ μ l	100	1299	504,81	371,91	61,98	p < 0,01
LINFOCITOS T/ μ l	435	9250	3923,61	1861,92	310,32	p = 0,86
LINFOCITOS NK/ μ l	49	478	164,25	98,33	16,39	p = 0,01
LINFOCITOS Th/ μ l	99	2708	1243,11	606,59	101,10	p = 0,73
LINFOCITOS Tc/ μ l	141	7034	2153,47	1548,13	258,02	p = 0,07
LINFOCITOS T γ δ / μ l	0	2275	518,47	572,53	95,42	p < 0,01

TABLA 4.6.12.- Estadísticos básicos de los valores absolutos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias en el día previo al tratamiento (T0) de los animales infectados por *Ehrlichia canis*.

T1	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS / μ l	6200	18300	10864,70	3481,90	844,50	p = 0,35
NEUTRÓFILOS/ μ l	2769	11005	5383,18	2178,26	528,30	p = 0,17
EOSINÓFILOS/ μ l	0	1040	304,18	311,75	75,61	p < 0,01
MONOCITOS/ μ l	0	238	59,65	83,50	20,25	p < 0,01
LINFOCITOS/ μ l	1674	13359	5117,71	2951,91	715,94	p < 0,01
LINFOCITOS B/ μ l	89	1230	475,54	376,98	91,43	p = 0,01
LINFOCITOS T/ μ l	1169	11783	4232,88	2732,16	662,65	p = 0,13
LINFOCITOS NK/ μ l	96	1009	362,92	243,68	59,11	p = 0,02
LINFOCITOS Th/ μ l	150	2816	1166,97	694,28	168,39	p = 0,39
LINFOCITOS Tc/ μ l	420	7520	2690,37	1986,99	481,92	p = 0,17
LINFOCITOS T γ δ / μ l	0	1457	376,09	346,89	84,13	p = 0,02

TABLA 4.6.13.- Estadísticos básicos de los valores absolutos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias de los perros infectados por *Ehrlichia canis*, en el primer control (T1) del estudio tras el tratamiento.

T2	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS / μ l	5800	15600	10734,70	2525,20	469,30	p = 0,42
NEUTRÓFILOS/ μ l	1859	9450	6101,50	2153,03	406,88	p = 0,14
EOSINÓFILOS/ μ l	0	1729	329,53	468,08	88,46	p = 0,11
MONOCITOS/ μ l	0	375	67,53	103,17	19,49	p = 0,08
LINFOCITOS/ μ l	1209	11154	4254,28	2372,18	448,30	p = 0,24
LINFOCITOS B/ μ l	167	979	388,85	236,09	45,43	p < 0,01
LINFOCITOS T/ μ l	733	9012	3438,18	2153,06	414,36	p = 0,12
LINFOCITOS NK/ μ l	59	1127	345,81	289,09	55,63	p < 0,01
LINFOCITOS Th/ μ l	197	3595	1161,88	742,67	142,93	p = 0,21
LINFOCITOS Tc/ μ l	183	5940	1902,19	1461,28	281,22	p = 0,09
LINFOCITOS T γ δ / μ l	0	1544	371,81	329,93	63,43	p = 0,05

TABLA 4.6.14- Estadísticos básicos de los valores absolutos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias en perros con Ehrlichiosis en el segundo control post-tratamiento (T2).

T3	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS / μ l	3300	16900	9968,40	3645,90	836,40	p = 0,31
NEUTRÓFILOS/ μ l	1400	12337	5658,53	3194,37	732,84	p = 0,64
EOSINÓFILOS/ μ l	0	1071	264,10	293,81	67,40	p = 0,04
MONOCITOS/ μ l	0	106	28,63	40,56	9,31	p < 0,01
LINFOCITOS/ μ l	1513	7050	4017,16	1904,92	437,02	p = 0,30
LINFOCITOS B/ μ l	152	1008	453,08	255,45	58,60	p = 0,11
LINFOCITOS T/ μ l	979	6148	3287,91	1790,68	410,81	p = 0,32
LINFOCITOS NK/ μ l	98	711	226,30	143,68	32,96	p = 0,04
LINFOCITOS Th/ μ l	262	2301	1084,68	578,87	136,44	p = 0,38
LINFOCITOS Tc/ μ l	170	4713	1832,25	1354,70	310,79	p = 0,04
LINFOCITOS T γ δ / μ l	0	1658	398,78	396,45	93,41	p = 0,01

TABLA 4.6.15.- Estadísticos básicos de los valores absolutos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias en perros con Ehrlichiosis en el tercer control post-tratamiento, el tiempo T3 del estudio.

T4	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
LEUCOCITOS / μ l	4000	15400	9853,60	3215,10	607,60	p = 0,71
NEUTRÓFILOS/ μ l	1170	9800	4813,39	2481,35	517,40	p = 0,94
EOSINÓFILOS/ μ l	0	1133	391,87	324,27	67,61	p = 0,12
MONOCITOS/ μ l	0	140	28,24	49,51	10,80	p < 0,01
LINOCITOS/ μ l	1440	9027	4264,25	2135,72	403,61	p = 0,08
LINOCITOS B/ μ l	107	1358	329,13	249,06	48,85	p < 0,01
LINOCITOS T/ μ l	1027	8612	3672,83	2100,85	412,01	p = 0,32
LINOCITOS NK/ μ l	8	2388	241,55	446,23	87,51	p < 0,01
LINOCITOS Th/ μ l	259	2583	1122,31	539,87	105,88	p = 0,69
LINOCITOS Tc/ μ l	210	6028	2155,32	1779,99	344,69	p < 0,01
LINOCITOS T γ δ / μ l	0	1002	307,52	250,74	50,15	p = 0,09

TABLA 4.6.16.- Estadísticos básicos de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias expresadas en valores absolutos en perros con Ehrlichiosis a los 180 días post-tratamiento (T4).

T0	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estándar	Error estándar	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	30,00	88,00	55,22	12,47	2,21	p = 0,82
EOSINÓFILOS %	0,00	9,00	2,50	2,64	0,47	p < 0,01
MONOCITOS %	0,00	4,00	0,94	1,01	0,18	p = 0,01
LINOCITOS %	11,00	68,00	39,76	13,25	2,15	p = 0,59
LINOCITOS B %	2,39	31,10	12,06	8,32	1,39	p < 0,01
LINOCITOS T %	54,20	95,10	81,83	10,26	1,71	p = 0,08
LINOCITOS NK %	0,92	9,74	3,84	2,19	0,36	p = 0,12
LINOCITOS Th %	9,06	52,10	27,05	9,51	1,58	p = 0,42
LINOCITOS Tc %	12,9	79,70	42,63	19,51	3,25	p = 0,01
LINOCITOST γ δ %	0,00	42,90	11,82	11,88	1,98	p < 0,01

TABLA 4.6.17.- Estadísticos básicos de las poblaciones leucocitarias expresados en valores relativos de leucocitos y de las subpoblaciones linfocitarias expresados valores relativos de linfocitos en el día previo al tratamiento de los animales infectados por *Ehrlichia canis*.

T1	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estánd.	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	23,00	79,00	50,76	15,61	3,78	p = 0,10
EOSINÓFILOS %	0,00	13,00	3,00	3,74	0,91	p < 0,01
MONOCITOS %	0,00	2,00	0,53	0,72	0,17	p < 0,01
LINFOCITOS %	20,00	73,00	45,71	16,08	3,90	p = 0,36
LINFOCITOS B %	2,03	28,80	11,38	9,24	2,24	p = 0,03
LINFOCITOS T %	53,60	94,40	79,99	12,00	2,91	p = 0,09
LINFOCITOS NK %	2,92	16,00	7,69	3,85	0,93	p = 0,94
LINFOCITOS Th %	8,45	44,18	23,76	10,93	2,65	p = 0,27
LINFOCITOS Tc %	16,81	74,12	49,06	17,91	4,34	p = 0,60
LINFOCITOST $\gamma\delta$ %	0,00	13,71	7,17	3,71	0,90	p = 0,74

TABLA 4.6.18.- Estadísticos básicos de las poblaciones leucocitarias expresados en valores relativos de leucocitos y de las subpoblaciones linfocitarias expresados valores relativos de linfocitos en el tiempo T1 del estudio (día 15 post-tratamiento) de los perros infectados por *Ehrlichia canis*.

T2	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estánd.	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	13,00	78,00	57,03	15,92	3,01	p = 0,21
EOSINÓFILOS %	0,00	13,00	2,86	3,70	0,70	p = 0,06
MONOCITOS %	0,00	3,00	0,68	0,98	0,18	p = 0,02
LINFOCITOS %	13,00	78,00	38,71	17,20	3,25	p = 0,83
LINFOCITOS B %	3,38	25,20	11,47	7,14	1,37	p = 0,01
LINFOCITOS T %	60,30	93,60	78,84	9,20	1,77	p = 0,56
LINFOCITOS NK %	2,05	23,80	8,54	5,34	1,03	p = 0,17
LINFOCITOS Th %	11,33	42,19	28,46	8,67	1,67	p = 0,37
LINFOCITOS Tc %	13,93	65,19	40,66	15,55	2,99	p = 0,26
LINFOCITOST $\gamma\delta$ %	0,00	20,82	9,61	5,82	1,12	p = 0,78

TABLA 4.6.19.- Estadísticos básicos de los valores relativos de las poblaciones leucocitarias expresados en valores relativos de leucocitos y de las subpoblaciones linfocitarias expresados en valores relativos de linfocitos en perros con Ehrlichiosis en el día 30 post-tratamiento, segundo control (T2).

T3	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estánd.	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	20,00	79,00	54,10	17,32	3,97	p = 0,40
EOSINÓFILOS %	0,00	9,00	3,32	3,54	0,81	p = 0,04
MONOCITOS %	0,00	2,00	0,47	0,70	0,16	p < 0,01
LINFOCITOS %	15,00	70,00	42,10	16,26	3,73	p = 0,73
LINFOCITOS B %	3,02	26,40	13,49	7,44	1,71	p = 0,85
LINFOCITOS T %	64,70	93,80	78,70	9,10	2,09	p = 0,64
LINFOCITOS NK %	2,38	14,50	6,41	3,41	0,78	p = 0,11
LINFOCITOS Th %	13,52	39,01	26,48	8,08	1,90	p = 0,54
LINFOCITOS Tc %	9,54	70,07	40,61	16,39	3,76	p = 0,40
LINFOCITOS $\gamma\delta$ %	0,00	33,83	10,71	9,12	2,15	p = 0,06

TABLA 4.6.20.- Estadísticos básicos de las poblaciones leucocitarias expresados en valores relativos de leucocitos y de las subpoblaciones linfocitarias expresados en valores relativos de linfocitos en perros con Ehrlichiosis en el tiempo T3 del estudio (90 días post-tratamiento).

T4	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estánd.	Test distr. N
NEUTRÓFILOS %	16,00	74,00	49,09	14,71	3,07	p = 0,69
EOSINÓFILOS %	0,00	11,00	4,00	3,06	0,64	p = 0,08
MONOCITOS %	0,00	2,00	0,39	0,58	0,12	p = 0,11
LINFOCITOS %	15,00	84,00	44,11	17,67	3,34	p = 0,90
LINFOCITOS B %	1,50	25,20	9,66	7,27	1,42	p = 0,01
LINFOCITOS T %	62,10	95,40	82,25	9,34	1,83	p = 0,03
LINFOCITOS NK %	0,94	35,10	5,59	6,60	1,29	p = 0,09
LINFOCITOS Th %	15,21	47,84	27,80	9,35	1,83	p = 0,22
LINFOCITOS Tc %	13,16	77,45	45,98	18,60	3,65	p = 0,52
LINFOCITOS $\gamma\delta$ %	0,00	27,19	8,70	6,51	1,28	p = 0,18

TABLA 4.6.21.- Estadísticos básicos de las poblaciones leucocitarias expresados en valores relativos de leucocitos y de las subpoblaciones linfocitarias expresados en valores relativos de linfocitos en perros con Ehrlichiosis a los 180 días tras iniciar el tratamiento (T4).

Las dos siguientes tablas muestran, para todos los tiempos del grupo de perros con Ehrlichiosis, los estadísticos básicos del índice neutrófilos/linfocitos y del índice linfocitario CD4/CD8.

Índice Neutrófilos/Linfocitos						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Ehrlichiosis T0	0,44	3,76	1,49	0,80	0,14	p = 0,29
Ehrlichiosis T1	0,32	3,95	1,42	0,99	0,24	p = 0,01
Ehrlichiosis T2	0,17	5,85	2,03	1,42	0,27	p = 0,14
Ehrlichiosis T3	0,29	5,07	1,77	1,43	0,33	p < 0,01
Ehrlichiosis T4	0,19	3,04	1,30	0,80	0,17	p = 0,03

TABLA 4.6.22.- Estadísticos básicos del índice Neutrófilos/Linfocitos en todos los tiempos del estudio del Grupo 2.

Índice CD4/CD8						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Ehrlichiosis T0	0,12	3,54	0,90	0,77	0,13	p < 0,01
Ehrlichiosis T1	0,13	2,63	0,68	0,67	0,16	p < 0,01
Ehrlichiosis T2	0,18	2,94	0,92	0,71	0,14	p = 0,03
Ehrlichiosis T3	0,19	1,66	0,74	0,43	0,10	p = 0,02
Ehrlichiosis T4	0,20	3,64	0,84	0,76	0,15	p = 0,05

TABLA 4.6.23.- Estadísticos básicos del índice linfocitario CD4/CD8 en todos los tiempos del estudio del Grupo 2.

En los siguientes gráficos se representan la evolución, a lo largo de los diferentes tiempos del estudio, de las variables referentes a poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias, en primer lugar en valores absolutos (gráficos 4.6.12 al 4.6.22), en segundo lugar en valores relativos (gráficos 4.6.23 al 4.6.32) y en tercer lugar la evolución de los índices neutrófilos/linfocitos y CD4/CD8 (gráficos 4.6.33 y 4.6.34).

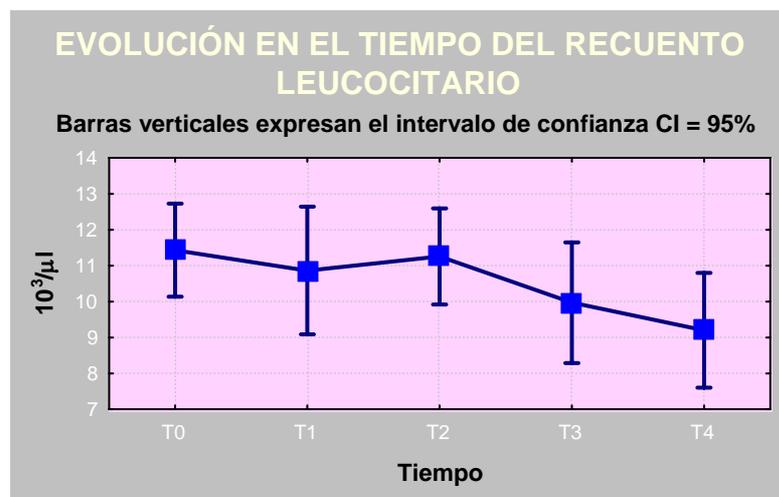


Gráfico 4.6.12.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de leucocitos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: F= 1,16; p= 0,33. Test Kruskal-Walis: Ht= 2,54; p= 0,64.

En los valores del recuento leucocitario no se observan diferencias significativas a lo largo de los diferentes tiempos del estudio.

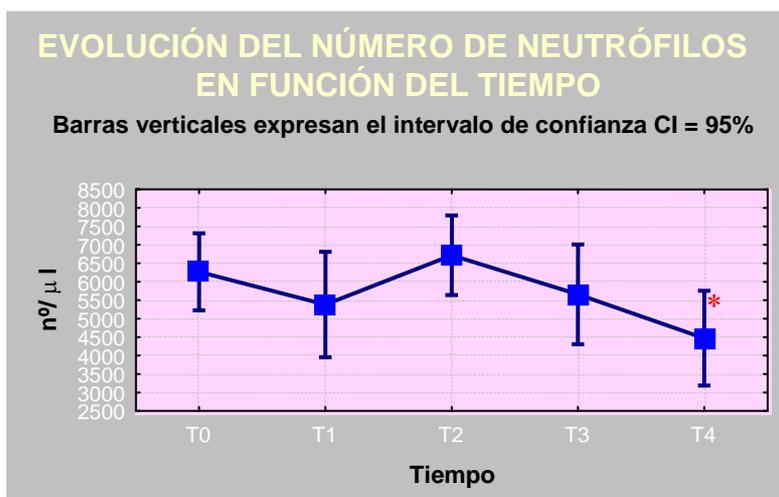


Gráfico 4.6.13.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de neutrófilos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,30$ $p = 0,27$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 6,96$ $p = 0,14$.

En perros con ehrlichiosis, el número de neutrófilos circulantes no mostró variaciones significativas a lo largo del estudio cuando se analiza globalmente, sin embargo el valor medio de neutrófilos en el tiempo T4 difiere de forma significativa del T0, (t student $t = 2,99$ $p = 0,05$, test de Wicoxon $z = 2,32$ $p = 0,02$), obteniéndose el valor medio más bajo de todos los controles efectuados.

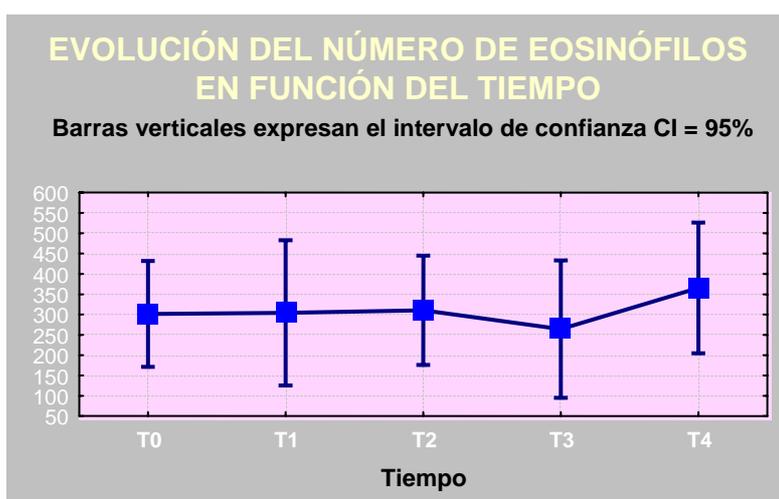


Gráfico 4.6.14- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de eosinófilos en perros con ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,35$ $p = 0,84$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 3,08$ $p = 0,54$.

En los perros con ehrlichiosis, no se apreciaron diferencias en el número de eosinófilos circulantes en los diferentes tiempos del estudio.

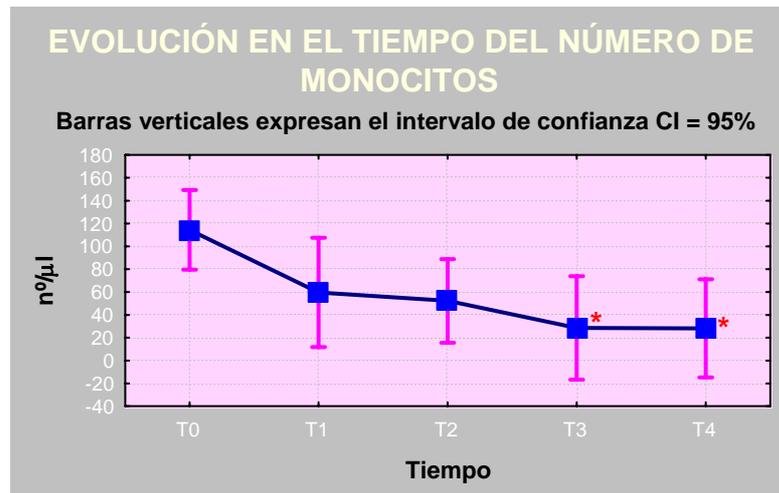


Gráfico 4.6.15.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de monocitos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 3,05$ $p = 0,02$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 8,25$ $p = 0,08$.

Existen diferencias estadísticamente significativas en el número de monocitos circulantes antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb, observándose una disminución progresiva de su número, que es significativa a partir del tiempo T3 de la investigación con respecto al tiempo T0 (Test t student: $t = 2,37$; $p = 0,02$ y Test Wilcoxon $z = -2,19$ $p = 0,02$).

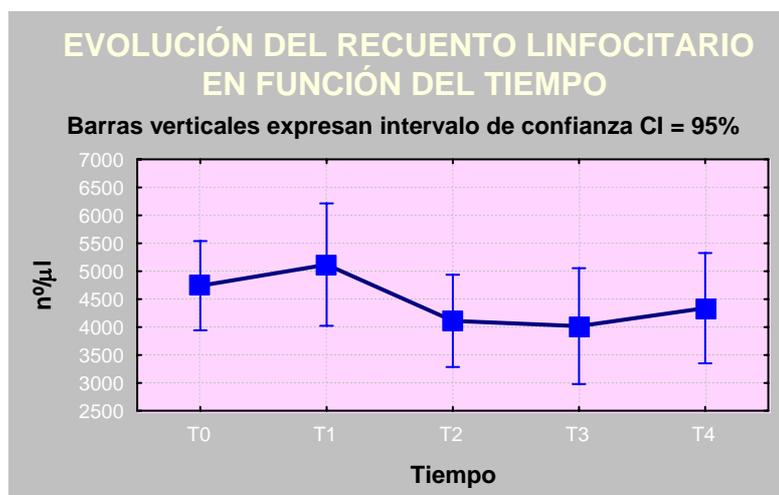


Gráfico 4.6.16.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de linfocitos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,69$ $p = 0,60$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 2,39$ $p = 0,66$.

A lo largo del tiempo del estudio, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el recuento absoluto de linfocitos en perros con ehrlichiosis tras la administración del tratamiento.

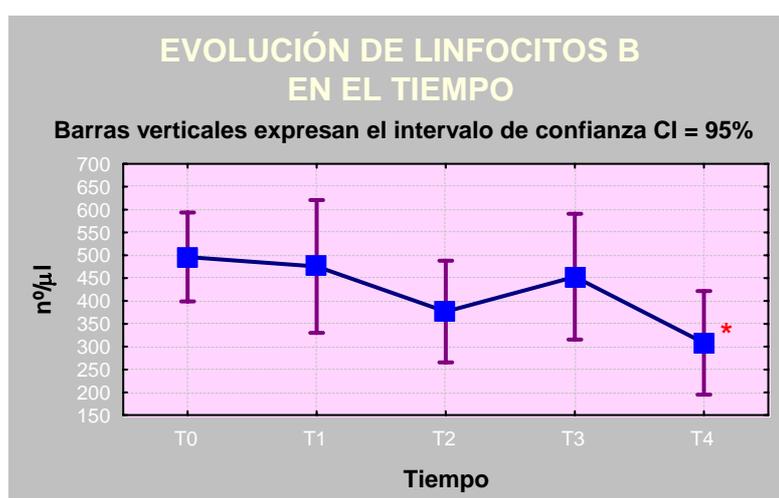


Gráfico 4.6.17.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de linfocitos B en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,48$ $p = 0,21$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 4,93$ $p = 0,29$.

Aunque se observa una disminución en el número absoluto de linfocitos B en el tiempo T4 con respecto a los valores previos al tratamiento (Test t student: $t = 2,01$; $p = 0,04$ y Test Wicoxon: $z = 1,81$; $p = 0,07$), los resultados del ANOVA y el test de Kruskal-Walis no detectan diferencias estadísticamente significativas entre los valores del recuento absoluto de linfocitos B a lo largo del tiempo.

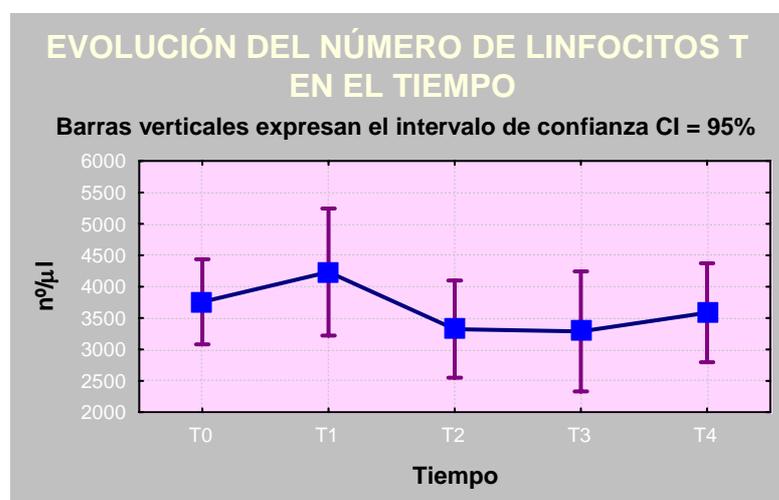


Gráfico 4.6.18.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento absoluto de linfocitos T en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,66$ $p = 0,62$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 2,87$ $p = 0,58$.

El número de linfocitos T circulantes, en perros con ehrlichiosis, no sufre variaciones significativas tras la administración del dipropionato de imidocarb a lo largo de la investigación.

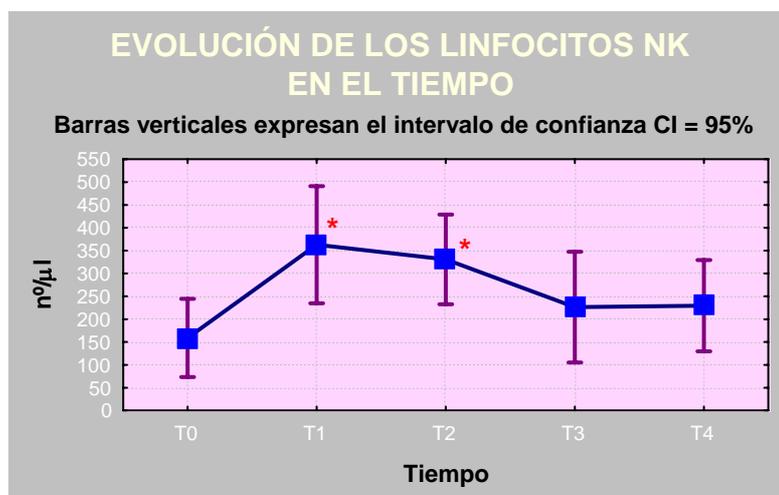


Gráfico 4.6.19.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de linfocitos NK en perros con Ehrlichiosis ANOVA: $F = 2,41$ $p = 0,04$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 23,22$ $p < 0,001$.

Existe un incremento estadísticamente significativo del número de linfocitos NK inmediatamente después del tratamiento con dipropionato de imidocarb (test de Wilcoxon número de linfocitos NK en el tiempo T0 frente al tiempo T1 $z = 3,67$ $p < 0,001$) que decrece progresivamente y significativamente hasta alcanzar valores similares a los iniciales a partir del tiempo T3.

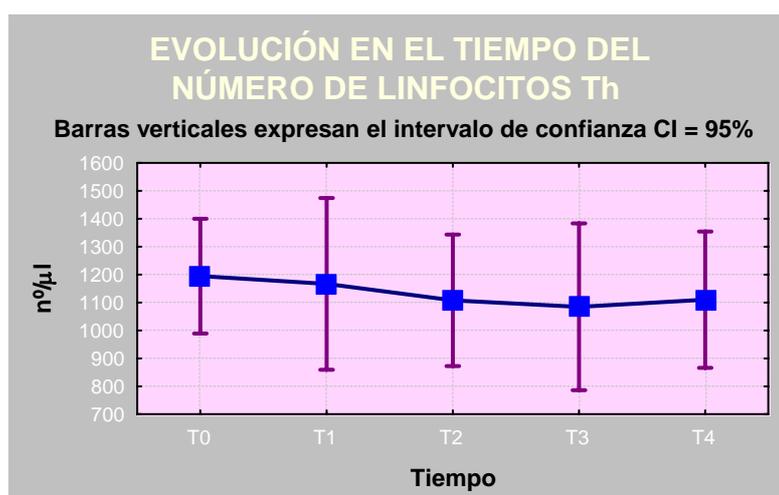


Gráfico 4.6.20.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de linfocitos Th en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,24$ $p = 0,92$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 1,41$ $p = 0,84$.

El número absoluto de linfocitos Th circulantes se muestran con unos valores medios prácticamente constantes en todo el tiempo del estudio, sin que se aprecien ninguna variación significativa en perros con ehrlichiosis tras el tratamiento.

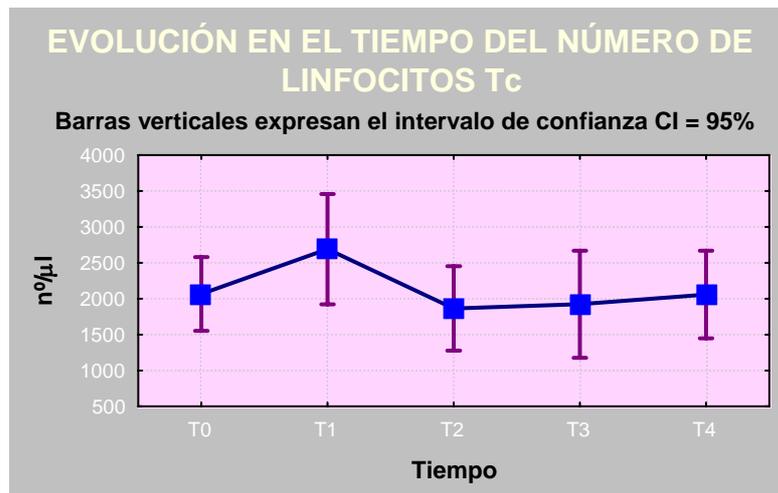


Gráfico 4.6.21.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de linfocitos T_c en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: F = 0,84 p= 0,50. Test Kruskal-Walis: Ht= 2,37 p= 0,67.

Igualmente, los valores absolutos de linfocitos T_c en sangre de perros con ehrlichiosis no sufren variaciones significativas a lo largo de los tiempos de estudio.

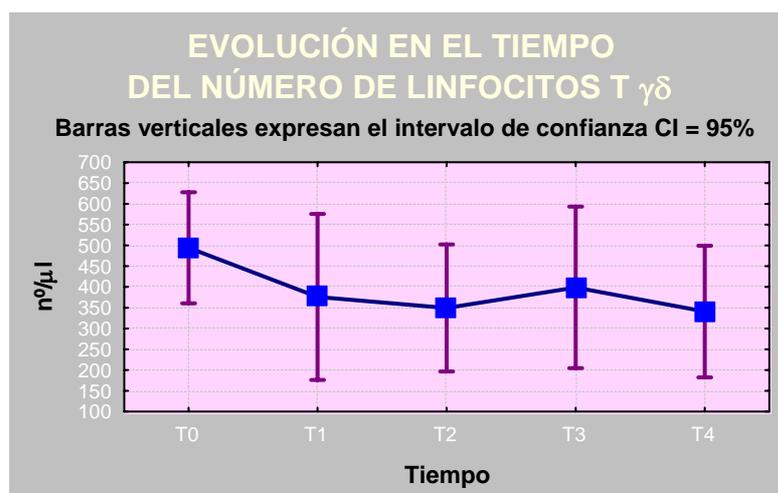


Gráfico 4.6.22.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento de linfocitos T_{γδ} en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: F = 1,08 p= 0,37. Test Kruskal-Walis: Ht= 0,89 p= 0,93.

Del mismo modo que para las anteriores subpoblaciones linfocitarias, no existen diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de linfocitos $T\gamma\delta$ en los diferentes tiempos de la investigación.

La evolución y el análisis estadístico de los valores de las distintas variables relativas a los recuentos leucocitarios e inmunofenotipo cuando son expresados en valores relativos (%), arroja unos resultados similares a los obtenidos con sus valores absolutos.

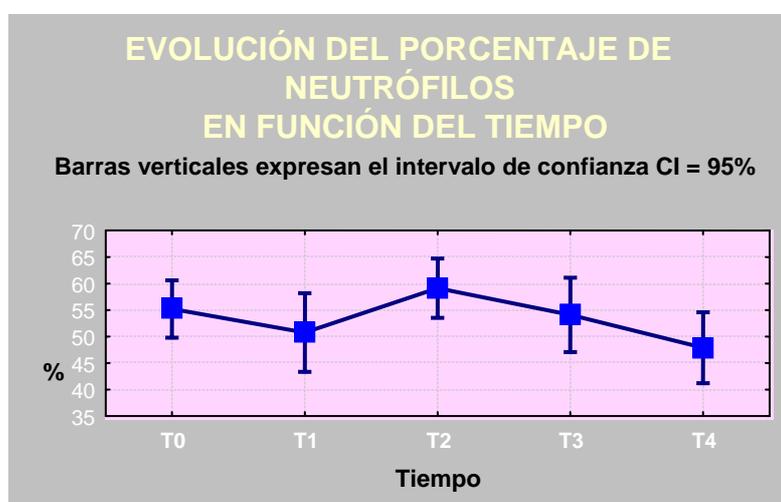


Gráfico 4.6.23.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de neutrófilos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,13$ $p = 0,34$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 4,64$ $p = 0,33$.

El recuento porcentual de neutrófilos no experimentó modificaciones significativas a lo largo del estudio en perros con ehrlichiosis.

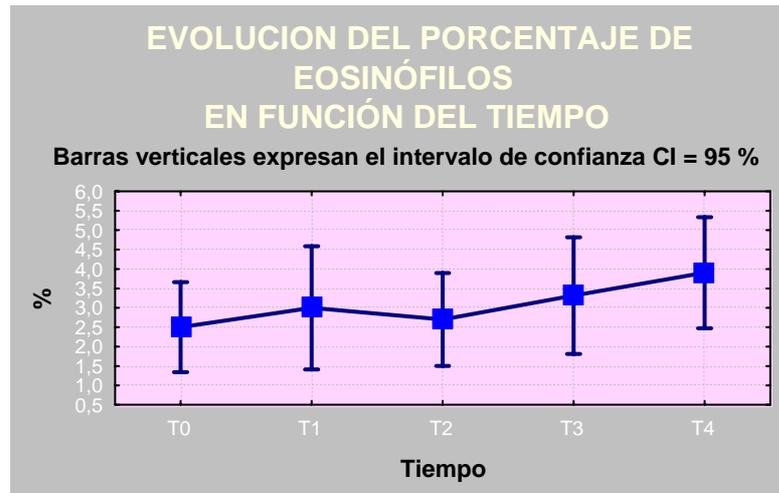


Gráfico 4.6.24.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de eosinófilos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,75$ $p = 0,56$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 4,67$ $p = 0,32$.

El recuento porcentual de eosinófilos no muestra diferencias significativas en los perros con ehrlichiosis a lo largo del tiempo.

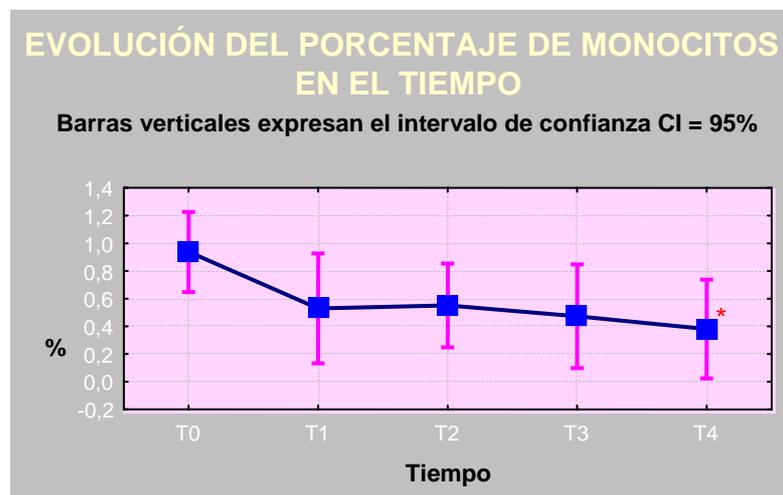


Gráfico 4.6.25.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de monocitos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,74$ $p = 0,15$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 5,61$ $p = 0,23$.

El recuento porcentual de monocitos muestra una disminución progresiva a lo largo del tiempo, existiendo diferencias significativas entre el tiempo T0 y el T4 de la investigación (Test t student: $t = 2,3$; $p = 0,02$ y Test Wicoxon: $z = 1,94$; $p = 0,05$). No obstante, el análisis estadístico no arroja globalmente diferencias significativas en esta variable a lo largo del tiempo.

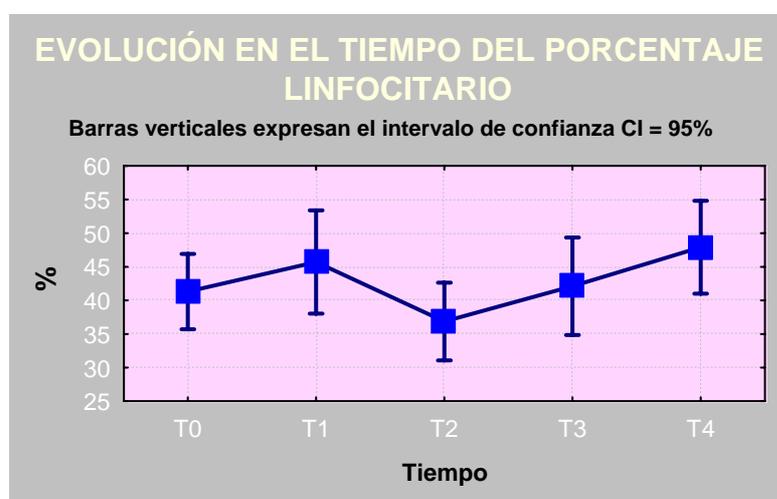


Gráfico 4.6.26.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,78$ $p = 0,54$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 2,70$ $p = 0,61$.

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el recuento porcentual de linfocitos, en perros con ehrlichiosis antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb.

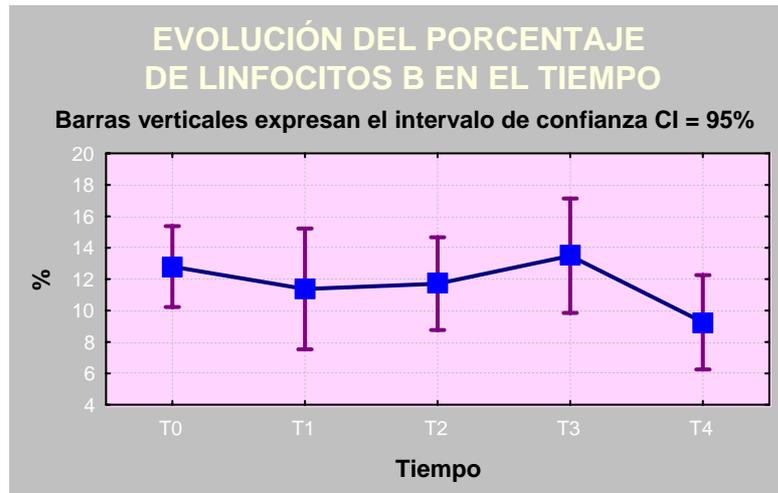


Gráfico 4.6.27.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos B en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,62$ $p = 0,65$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 3,07$ $p = 0,54$.

El análisis evolutivo del recuento porcentual de linfocitos B, aunque muestra un descenso en el valor obtenido en el T4, no ofrece variaciones significativas en los animales con ehrlichiosis de nuestro estudio.

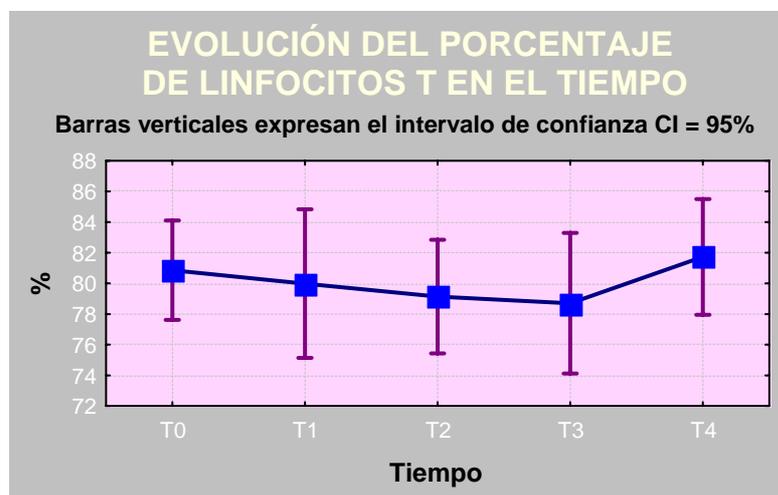


Gráfico 4.6.28.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos T en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,72$ $p = 0,58$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 3,38$ $p = 0,49$.

El estudio del recuento porcentual de linfocitos T circulantes, antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb, no ofrece diferencias estadísticamente significativas.

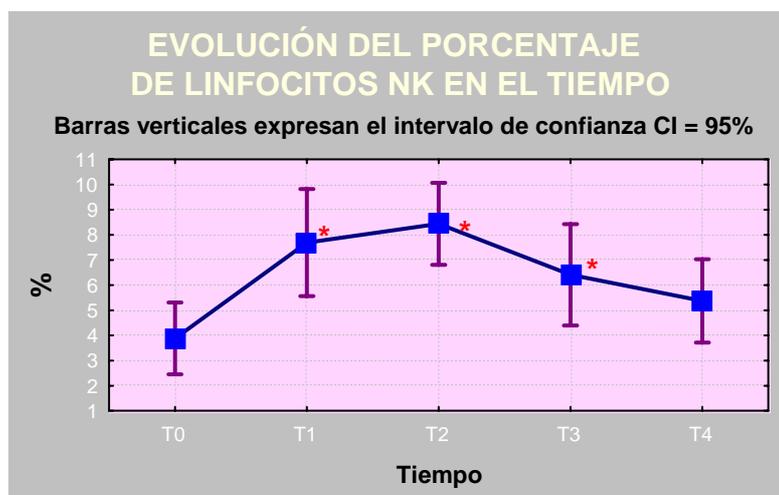


Gráfico 4.6.29.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos NK en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 4,86$ $p = 0,01$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 29,02$ $p < 0,0001$.

Existen diferencias estadísticamente significativas en el recuento porcentual de linfocitos NK, en los perros con ehrlichiosis antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb. Este incremento es significativo para los tiempos T1, T2 y T3 con respecto al T0, en el tiempo 4 el incremento observado no es estadísticamente significativo.

En los gráficos del 4.6.30 al 4.6.32 se muestra la evolución en el tiempo de los valores de las diferentes subpoblaciones linfocitarias. Los valores relativos de estas variables se refieren a población linfocitaria.

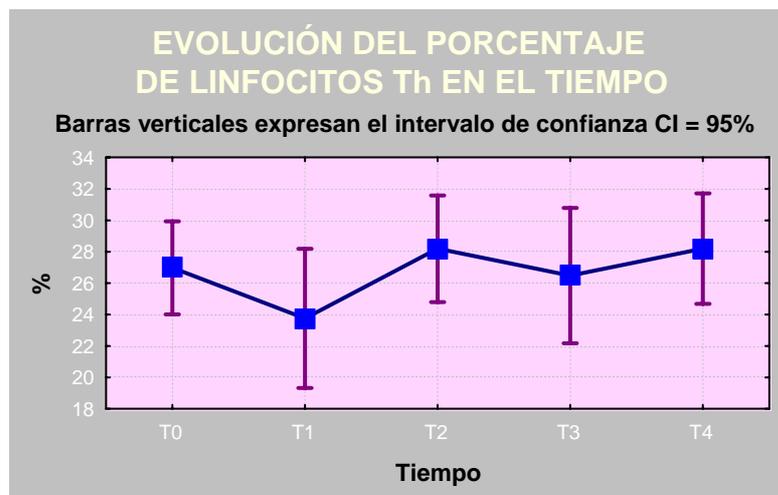


Gráfico 4.6.30.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos Th en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,74$ $p = 0,37$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 2,99$ $p = 0,56$.

No existen diferencias estadísticamente significativas en el recuento porcentual de linfocitos Th, antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb.

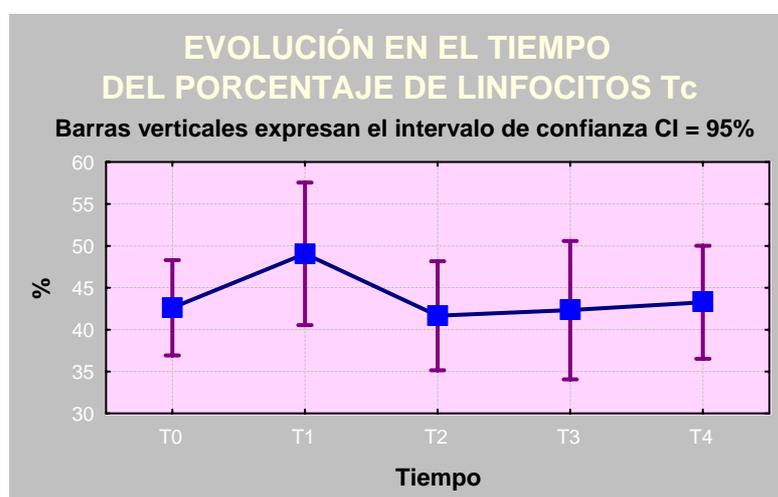


Gráfico 4.6.31.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos Tc en perros con ehrlichiosis ANOVA: $F = 0,85$ $p = 0,49$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 3,46$ $p = 0,48$.

A lo largo del tiempo estudiado no se observan variaciones estadísticamente significativas en el valor relativo de los linfocitos Tc circulantes de animales con ehrlichiosis.

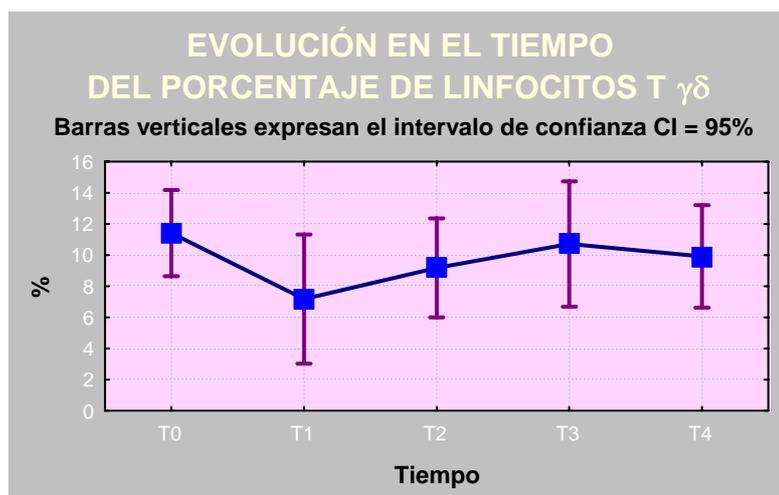


Gráfico 4.6.32.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos T $\gamma\delta$ en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: F = 1,08 p= 0,37. Test Kruskal-Walis: Ht = 1,75 p = 0,78.

No se aprecian variaciones estadísticamente significativas en el recuento porcentual de linfocitos T $\gamma\delta$ en los periodos previo y posteriores al tratamiento con dipropionato de imidocarb.

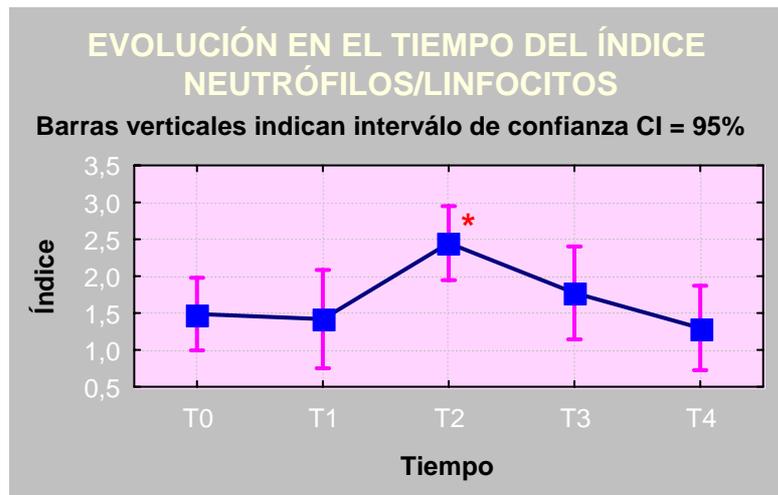


Gráfico 4.6.33.- Evolución a lo largo del tiempo del índice neutrófilos/linfocitos en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 1,75$ $p = 0,14$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 4,10$ $p = 0,39$.

Aunque los tests estadísticos no revelan diferencias estadísticamente significativas en la evolución global del índice neutrófilos/linfocitos tras el tratamiento con dipropionato de imidocarb, cuando los valores medios se comparan dos a dos se observa un aumento significativo del índice neutrófilos/linfocitos en el tiempo T2 de la investigación, con respecto al valor inicial T0 (Test t student: $t = 2,19$; $p = 0,003$ y Test de Wilcoxon: $z = 1,73$; $p = 0,08$).

La siguiente gráfica muestra la evolución en el tiempo de los valores del **índice CD4/CD8** en perros con ehrlichiosis.

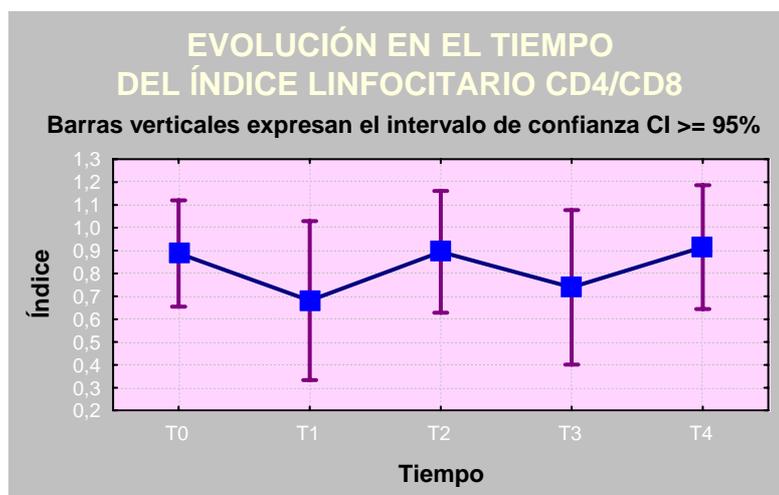


Gráfico 4.6.34.- Evolución a lo largo del tiempo del valor del índice linfocitario CD4/CD8 (Th/Tc) en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: $F = 0,46$ $p = 0,76$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 3,90$ $p = 0,42$.

En los animales con ehrlichiosis estudiados, no existen diferencias estadísticamente significativas en el valor del índice CD4/CD8 antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb.

4.6.5 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS REFERIDAS A LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS T

Las tablas 4.6.24- 4.6.26 muestran los estadísticos básicos del valor porcentual de las subpoblaciones T-linfocitarias referido a la población de linfocitos T. Se muestran los resultados en los cinco tiempos del estudio en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

A continuación, se detalla gráficamente la evolución en el tiempo de estos valores de las subpoblaciones linfocitarias expresadas como porcentaje de linfocitos T (gráficas de la 4.6.35 a la 4.6.37).

Linfocitos Th como % de linfocitos T						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Ehrlichiosis T0	10,38	65,63	33,87	13,41	2,23	p = 0,27
Ehrlichiosis T1	10,70	63,20	30,80	16,08	3,90	p = 0,08
Ehrlichiosis T2	12,90	56,00	36,73	11,91	2,29	p = 0,84
Ehrlichiosis T3	14,80	52,10	33,83	11,56	2,72	p = 0,31
Ehrlichiosis T4	15,90	71,30	34,81	14,32	2,80	p = 0,27

TABLA 4.6.24.- Estadísticos básicos de la población de linfocitos T auxiliares expresados como porcentaje de células T en todos los tiempos del estudio del grupo de perros con Ehrlichiosis.

Linfocitos Tc como % de linfocitos T						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Ehrlichiosis T0	17,14	89,37	51,33	19,35	3,22	p = 0,71
Ehrlichiosis T1	24,10	84,80	60,01	17,24	4,18	p = 0,21
Ehrlichiosis T2	18,40	76,60	50,66	16,00	3,05	p = 0,53
Ehrlichiosis T3	14,74	76,66	50,32	16,42	3,77	p = 0,28
Ehrlichiosis T4	19,60	83,50	54,22	17,30	3,39	p = 0,99

TABLA 4.6.25.- Estadísticos básicos de la población de linfocitos T citotóxicos expresados como porcentaje de células T en todos los tiempos del estudio del grupo de perros con Ehrlichiosis.

Linfocitos T $\gamma\delta$ como % de linfocitos T						
	Valor mín.	Valor máximo	Media	Desv. estánd.	Error estándar	Test distr. N
Ehrlichiosis T0	0	51,59	14,80	14,75	2,46	p < 0,01
Ehrlichiosis T1	0	16,4	9,21	4,75	1,15	p = 0,27
Ehrlichiosis T2	0	27,5	12,60	7,93	1,53	p = 0,89
Ehrlichiosis T3	0	42,61	13,16	11,77	2,70	p = 0,19
Ehrlichiosis T4	0	32,60	11,01	8,52	1,67	p = 0,07

TABLA 4.6.26.- Estadísticos básicos de las subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ expresados como porcentaje de células T en todos los tiempos del estudio del grupo de perros con Ehrlichiosis.

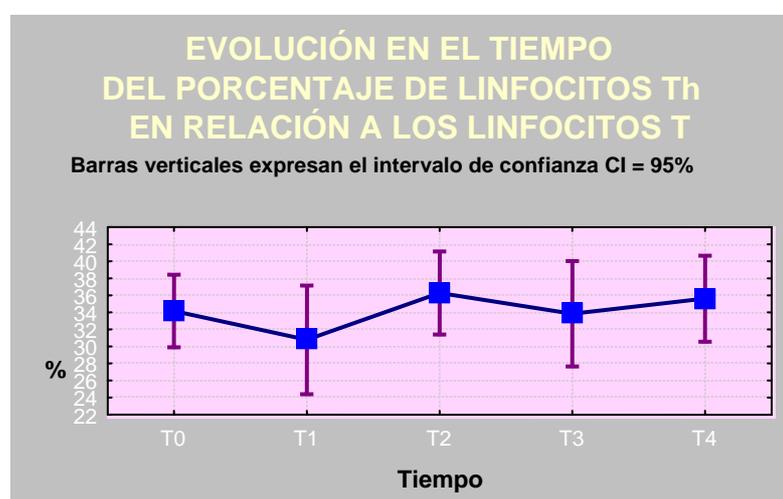


Gráfico 4.6.35.- Evolución a lo largo del tiempo del recuento porcentual de linfocitos Th referido a linfocitos T en perros con Ehrlichiosis. ANOVA: F = 0,53 p = 0,73. Test Kruskal-Walis: Ht = 3,78 p = 0,44.

A lo largo del tiempo, no existen diferencias estadísticamente significativas en el valor de los recuentos de linfocitos Th, expresado como porcentaje de linfocitos T.

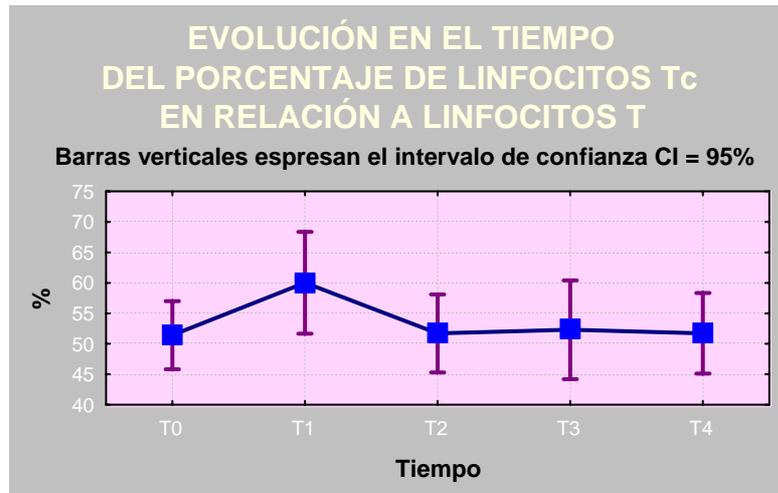


Gráfico 4.6.36.- Evolución a lo largo del tiempo del valor de linfocitos T_c expresado como porcentaje de linfocitos T en perros con ehrlichiosis ANOVA: $F = 1,02$ $p = 0,40$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 4,74$ $p = 0,31$.

El valor de la población de linfocitos T_c, expresado como porcentaje de linfocitos T, no sufre variaciones significativas a lo largo del tiempo del estudio.

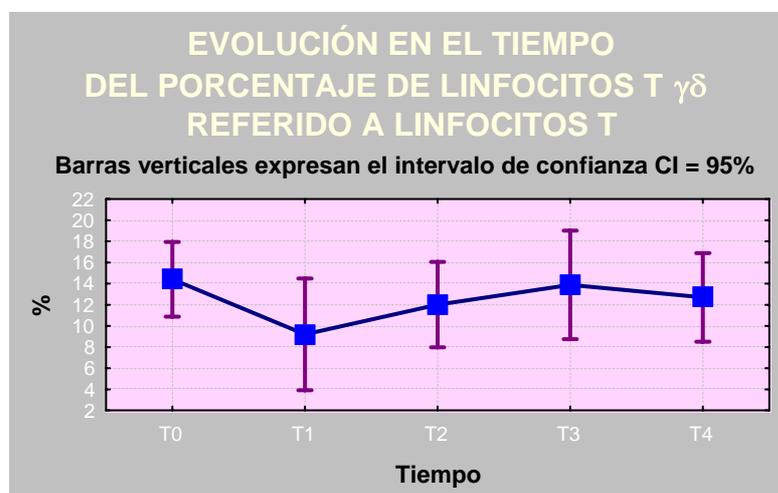


Gráfico 4.6.37.- Evolución a lo largo del tiempo del valor de linfocitos T $\gamma\delta$ expresado como porcentaje de linfocitos T en perros con ehrlichiosis ANOVA: $F = 0,95$ $p = 0,44$. Test Kruskal-Walis: $H_t = 1,66$ $p = 0,80$.

Al igual que las subpoblaciones anteriores, en la evolución de los animales con ehrlichiosis, no se observan variaciones estadísticamente significativas en el valor del recuento de linfocitos T $\gamma\delta$, expresado como porcentaje de linfocitos T.

A continuación, y a modo de resumen, recogemos los parámetros biopatológicos en los que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en los distintos controles tras la administración del tratamiento.

De los parámetros biopatológicos investigados, debemos señalar que durante el seguimiento pocos son los que sufren modificaciones significativas y, cuando éstas se producen en general son de una intensidad moderada.

En principio, era previsible que los parámetros biopatológicos que se encontraban alterados en los perros con Ehrlichiosis con respecto al grupo Control sufrieran las mayores modificaciones con una tendencia a su normalidad. Sin embargo este hecho no se comprobó en todas las variables.

Dentro de los parámetros de la serie roja se comprueba un incremento significativo post-tratamiento de la concentración de hemoglobina que a su vez provoca ligeros incrementos de los índices de concentración media de hemoglobina (CMH) y concentración media corpuscular de hemoglobina (CMCH).

El valor medio del recuento plaquetario no sufre variaciones significativas, obteniéndose durante todos los controles de seguimiento unas cifras similares. No obstante, en el estudio pormenorizado de los casos comprobamos como a los 6 meses post-tratamiento sólo 4 perros presentan una marcada trombocitopenia (por debajo de 100.000 plaquetas por microlito) y sólo dos de estos perros han presentado una trombocitopenia persistente en todos los controles efectuados.

Los parámetros del proteinograma en los perros con ehrlichiosis obtenidos en el momento del diagnóstico eran los que presentaban mayores alteraciones y diferencias significativas con respecto al grupo Control, y por ello era previsible modificaciones en el curso del seguimiento. Sin embargo, aunque se observan algunas modificaciones en la evolución de las proteínas totales y globulinas séricas al alza en el primer control post-tratamiento y una tendencia a la baja en los siguientes controles, ni en estas variables ni en

la concentración de albúmina ni en el cociente Albúmina/Globulina se constatan cambios definitivos a los 6 meses post-tratamiento con respecto a los valores iniciales. En el gráfico 4.6.38 se representa la evolución en el tiempo de los valores de tres variables proteicas (proteínas totales, albúmina y globulinas) en la población con ehrlichiosis objeto de estudio. No obstante estudiando pormenorizadamente los casos a los 6 meses post-tratamiento se comprueba que si bien la disproteinemia persiste en la mayoría de ellos, no se observa ninguna hipoalbuminemia por debajo de los 2 g/dl ni ninguna hiperglobulinemia por encima de los 8 g/dl, permaneciendo los valores de las proteínas totales séricas por encima de los 6 g/dl en todos los casos. Es decir los casos iniciales con hipoproteinemia habían desaparecido si bien persisten los casos de hiperproteinemia, aunque algunos de ellos con cifras más moderadas.

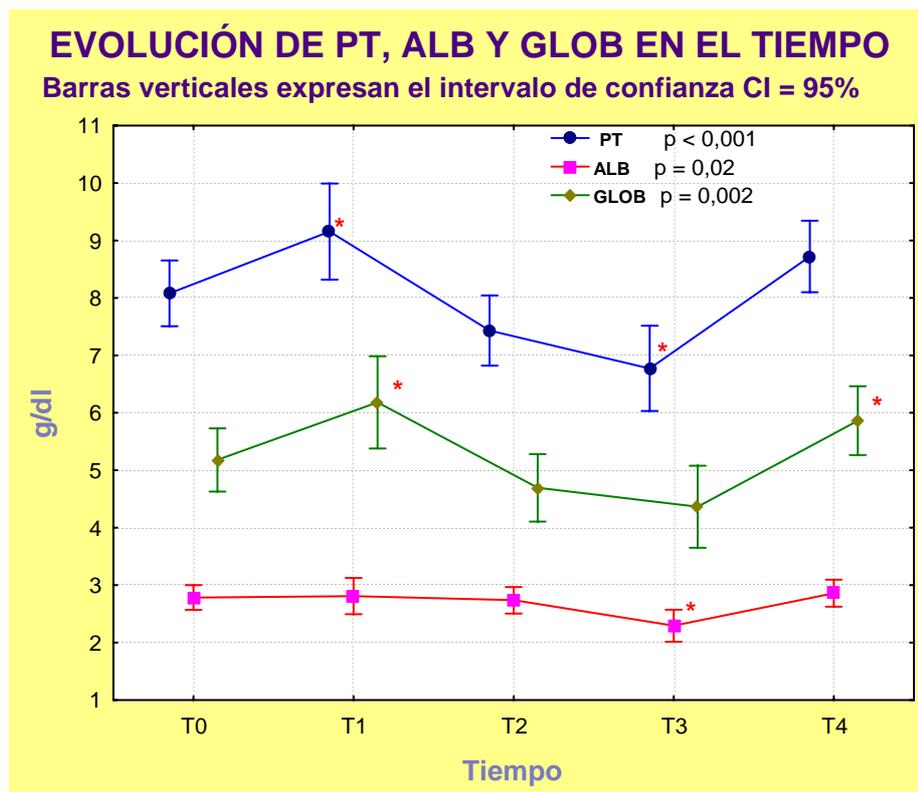


Gráfico 4.6.38.- Representación gráfica conjunta de las diferentes concentraciones de proteínas séricas a lo largo del tiempo en el grupo de perros con Ehrlichiosis tras la administración del tratamiento.

En relación a la serie leucocitaria y las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, llama la atención la práctica ausencia de modificaciones en todas ellas a lo largo de la evolución post-tratamiento, y con excepción del valor medio del recuento de los linfocitos B, de los monocitos y en menor medida de los neutrófilos, los que sufren un descenso en sus valores, el resto de los parámetros no presentan modificaciones significativas a los 6 meses post-tratamiento con respecto a los valores iniciales.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 PREVALENCIA DE EHRLICHIOSIS CANINA EN LAS POBLACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

Hasta la fecha y a conocimiento del autor, existen pocos estudios epidemiológicos realizados sobre ehrlichiosis en España, si bien todos ellos, revelan una alta prevalencia de la enfermedad. Un estudio del año 2000 sitúa la tasa de seroprevalencia de ehrlichiosis canina en la provincia de Valencia en el 13,7% (González *et al*, 2000).

Tal y como se refleja en el capítulo de resultados, en las protectoras incluidas en el estudio, encontramos una seroprevalencia de ehrlichiosis canina del 69,37%. Esta prevalencia tan elevada parece responder más a las peculiaridades de la población estudiada, que a la realidad de la población canina en la provincia de Valencia. Otros autores ya han señalado que el hábitat y la aptitud influyen en el riesgo a padecer la infección, habiendo observado prevalencias del 60-70% en perros de colectividades (Tesouro *et al*, 2001).

En cualquier caso, la prevalencia tan alta encontrada en nuestra población canina es indicativa de la importancia en la zona y de la capacidad infectiva del agente vector, *Rhipicephalus sanguineus*, así como del riesgo real de la enfermedad en esta área geográfica y la necesidad de aplicar medidas profilácticas adecuadas que impidan la transmisión del agente infeccioso, en especial en este tipo de población.

Por otra parte, el hecho de que en una zona endémica de leishmaniosis, la seroprevalencia frente a esta enfermedad (28,12%) sea mucho menor que la encontrada

frente a ehrlichiosis, pone aún más de manifiesto la importancia de esta enfermedad rickettsial en esta área geográfica. Si bien la ehrlichiosis puede considerarse en líneas generales una enfermedad menos grave, su alta prevalencia hace necesario incidir en la toma de medidas profilácticas frente a ella.

La presencia de concurrencias de ehrlichiosis y leishmaniosis en las colectividades de procedencia de nuestra población se presenta en el 21,87%, lo que muestra que la gran mayoría de perros seropositivos a leishmaniosis, 7 de cada 9, también son positivos a ehrlichiosis en esta población.

Las alteraciones inmunológicas presentes tanto en el curso de la ehrlichiosis como de la leishmaniosis, pueden condicionar la presencia simultánea de ambas enfermedades en un mismo animal. De hecho, algunos autores afirman que la existencia de una de estas infecciones favorece el desarrollo de la otra, así como el desarrollo de otros procesos infecciosos concurrentes (Abranches *et al*, 1991). En este sentido, aunque no se han realizado estudios de prevalencia, en las colectividades caninas estudiadas también se ha observado concurrencia de ehrlichiosis y hepatozoonosis canina.

5.2 POBLACIÓN CONTROL

La población control en la presente investigación, se caracterizó por la ausencia de anticuerpos circulantes frente a *Ehrlichia canis* y *Leishmania infantum*, así como por presentar un estado saludable a la exploración física general. En esta población se realizó un estudio hematológico completo y un estudio de proteínas séricas, que complementaron el chequeo clínico destinado a la confirmación de encontrarnos ante una población sana. Se estudiaron también las características inmunofenotípicas de sus poblaciones linfocitarias, como referente comparativo para el estudio realizado sobre perros con ehrlichiosis.

5.2.1 HEMATOLOGÍA: ERITROGRAMA, INDICES ERITROCITARIOS Y PLAQUETAS

Los valores obtenidos para nuestra población control se encontraron dentro de los rangos fisiológicos para cada una de las variables estudiadas. Nuestra población es un reflejo a pequeña escala de las características hematológicas de perros sanos (Meinkoth, 2000) y es un buen referente para el ulterior análisis comparativo entre perros con y sin ehrlichiosis.

5.2.2 PROTEÍNAS SÉRICAS

Los valores de proteínas séricas de nuestra población control se ajustan a los rangos fisiológicos descritos en perros (Tesouro *et al*, 1995). Estos datos nos permiten el posterior estudio comparativo entre población sana y con ehrlichiosis. Únicamente se encontraron 2 animales con una ligera hiperproteinemia por hiperglobulinemia y dado que se acompañaban igualmente de una ligera hiperalbuminemia podemos admitir que posiblemente estos animales presentaran un cierto grado de deshidratación.

5.2.3 RECUENTO LEUCOCITARIO Y RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

Tal y como se describió en resultados tan sólo se observó un animal con ligera eosinofilia (1450 eosinófilos/ μ l) y otro con ligera linfocitosis (5180 linfocitos/ μ l), el resto de los resultados del recuento leucocitario y diferencial en la población control de nuestra investigación se encuentran dentro del rango fisiológico descrito para perros sanos (Meinkoth, 2000), lo que es compatible con la percepción de una población clínicamente saludable.

5.2.4 POBLACIONES LINFOCITARIAS: INMUNOFENOTIPO

La citometría de flujo y el empleo de anticuerpos monoclonales de manera pareada nos ha permitido caracterizar cada una de las estirpes linfocitarias en los perros objeto de esta investigación.

Para poder evaluar más correctamente los resultados obtenidos en el inmunofenotipo de los perros con ehrlichiosis, se realizó el mismo estudio en 18 animales sanos, exentos de ehrlichiosis y leishmaniosis y que compartían las mismas condiciones de alojamiento y manejo que los animales enfermos. Estos resultados sirven de referencia para poder evaluar los cambios producidos en las poblaciones linfocitarias de los perros con ehrlichiosis incluidos en este estudio.

Existen pocos estudios en los que se describa el inmunofenotipo de perros sanos. Tras la búsqueda bibliográfica llevada a cabo para localizar fuentes que pudieran indicar los valores de las distintas poblaciones linfocitarias en perro sano, se han encontrado sólo dos estudios con este objetivo (Byrne *et al*, 2000; Faldyna *et al*, 2001). En ambas investigaciones las diferentes poblaciones linfocitarias estudiadas eran caracterizadas por marcación con un único anticuerpo monoclonal. Existen en la bibliografía otros trabajos que describen poblaciones linfocitarias en sangre periférica de perros sanos, si bien en estas investigaciones estos valores eran empleados como referencia para discutir los resultados de la propia investigación. Las líneas de investigación de cada uno de esos estudios son muy diversas. Algunos trabajos comparan el inmunofenotipo de sangre periférica de perros sanos con el de diferentes tejidos de esos mismos animales, como líquido cefalorraquídeo (Duque *et al*, 2002), hígado (Sakai *et al*, 2003) o lavado bronquial (Dirscherl *et al*, 1995), mientras que otros lo comparan con el inmunofenotipo de sangre periférica en perros con diferentes patologías: pioderma del pastor alemán (Chabanne *et al*, 1995), leishmaniosis (Bourdoiseau *et al*, 1997), demodicosis (Caswell *et al*, 1997) o linfoma (Winnicka *et al*, 2002).

El número de animales control empleados en estos estudios es muy variable: de 5 (Caswell *et al*, 1997) a 54 individuos (Faldyna *et al*, 2001). En nuestro trabajo hemos caracterizado el inmunofenotipo en 18 perros sanos, siendo este número superior al registrado en la mayoría de los estudios recopilados.

Se ha descrito que la raza y la edad influyen en la distribución de los linfocitos circulantes en perros (Greeley *et al*, 1996; Faldyna *et al*, 2001). En los diferentes trabajos consultados no existe homogeneidad en cuanto a las características etarias y raciales de los perros incluidos en los diferentes estudios, habiendo trabajos realizados en Beagle (Dirschell *et al*, 1995; Gebhard y Carter, 1992; Sakai *et al*, 2003; Otani *et al*, 2002) o en perros de distintas razas (Rivas, 1995; Caswell, 1997; Bourdoiseau *et al*, 1997; Winnicka *et al*, 2002; Guarga *et al*, 2000; Faldyna *et al*, 2001; Duque *et al*, 2002). Los perros incluidos en nuestro estudio pertenecían a distintas razas y edades, aunque todos eran adultos.

A la hora de comparar los resultados de las referencias consultadas y de nuestro estudio, hay que considerar que nuestra investigación es única en el sentido de que estudia una población canina procedente de protectoras, población que, a conocimiento del autor, no ha sido estudiada inmunofenotípicamente con anterioridad.

Los diferentes estudios recopilados emplean, al igual que el nuestro, los siguientes anticuerpos monoclonales para la identificación de las diferentes estirpes linfocitarias: anti-CD5 o anti-CD3 como marcador de células T; anti-CD8 como marcador de linfocitos Tc, anti-CD4 como marcador de linfocitos Th; anti-CD21 como marcador de linfocitos B. En la mayoría de estos estudios los anticuerpos monoclonales provenían, incluso, de la misma fuente que en nuestra investigación (Laboratorio del Dr.P.F. Moore en UC Davis, California).

Sin embargo, en nuestra investigación, las poblaciones linfocitarias se describen en función de su marcaje simultáneo con dos de estos anticuerpos monoclonales, mientras que en todas las investigaciones recopiladas, con la excepción de dos de ellas, se identifican

por marcaje con un sólo anticuerpo monoclonal. Consideramos, al igual que otros autores (Grindem, 1996), que es recomendable el empleo de dos o más marcadores simultáneos por cada población linfocitaria para garantizar la pureza de las mismas.

En las tablas siguientes se detallan los valores recopilados de los distintos estudios publicados; en la última línea de cada tabla se muestran los valores obtenidos en la presente investigación.

5.2.4.1 Poblaciones linfocitarias

LINFOCITOS T				
Ac monoclonales empleados	N	MEDIA	DS	REFERENCIA
CD5	12	84,10	9,50	Chabanne <i>et al</i> , 1995
CD5	12	71,00	10,40	Dirscherl <i>et al</i> , 1995
CD5	28	83,30	3,50	Byrne <i>et al</i> , 2000
CD5	24	61,56	3,04	Winnicka <i>et al</i> , 2002
CD3	54	80,00	7,40	Faldyna <i>et al</i> , 2001
CD3	11	85,40	6,50	Sakai <i>et al</i> , 2002
CD3⁺ CD21⁻	30	85,10	6,80	Otani <i>et al</i> , 2003
CD3⁺ CD21⁻	18	72,87	6,04	Tesis presentada

TABLA 5.2.1.- Detalle de estadísticos básicos de los valores porcentuales de linfocitos T definidos en siete referencias y en la tesis presentada, así como la marcación con anticuerpos monoclonales empleada en cada estudio.

Se puede observar una similitud en los valores de linfocitos T obtenidos en los diferentes estudios, si bien podemos apreciar un valor porcentual menor en nuestro estudio

que en la mayoría de ellos. Tan sólo dos investigadores obtuvieron valores inferiores a los encontrados en nuestro trabajo.

LINFOCITOS B				
Ac monoclonales empleados	N	MEDIA	DS	REFERENCIA
CD21	12	12,20	6,00	Chabanne <i>et al</i> , 1995
CD21	5	28,70		Caswell <i>et al</i> , 1997
CD21	28	12,90	3,90	Byrne <i>et al</i> , 2000
CD21	54	14,40	5,90	Faldyna <i>et al</i> , 2001
CD21	23	18,80	9,10	Duque <i>et al</i> , 2002
CD21	24	5,12	0,20	Winnicka <i>et al</i> , 2002
CD3⁻CD21⁺	11	9,30	6,10	Sakai <i>et al</i> , 2003
CD3⁻CD21⁺	18	18,41	6,29	Tesis presentada

TABLA 5.2.2.- Detalle de los estadísticos básicos de los valores porcentuales de linfocitos B definidos en siete referencias y en la tesis presentada, así como la marcación con anticuerpos monoclonales empleada en cada estudio.

Aunque existe una cierta variabilidad en los valores obtenidos para los linfocitos B circulantes en sangre periférica de perros sanos según los diferente autores, podemos considerar que nuestros resultados se ajustan a los valores referenciados en la bibliografía consultada y señalados en la tabla 5.2.2.

LINFOCITOS NK				
Ac monoclonales empleados	N	MEDIA	DS	REFERENCIA
CD3⁺CD21⁻	30	2,9	1,1	Otani <i>et al</i> , 2002
CD3⁺CD21⁻	11	5,3	1,8	Sakai <i>et al</i> , 2003
CD3⁺CD21⁻	18	7,30	2,63	Tesis presentada

TABLA 5.2.3.- Detalle de los estadísticos básicos de los valores porcentuales de linfocitos NK definidos en dos referencias y en la tesis presentada, así como la marcación con anticuerpos monoclonales empleada en cada estudio.

Los linfocitos no T no B son considerados linfocitos Natural Killer (NK) (McDonough y Moore, 2000). Hasta el momento actual no se ha encontrado marcador para los linfocitos NK caninos. En el hombre se ha identificado el CD56 (Sakai *et al*, 2003, Otani *et al*, 2002) como marcador para estas células; sin embargo el empleo de este marcador en perros sólo ha demostrado su expresión en linfocitos T CD3⁺ (Otani *et al*, 2002). En nuestro estudio, tal y como han sugerido otros autores (Sakai *et al*, 2003), equiparamos la población de linfocitos CD3⁺CD21⁻, no T no B, a la población de linfocitos Natural Killer.

Los valores obtenidos para esta población en nuestra investigación son superiores a los observados por otros autores. Los escasos estudios al respecto y la variación existente entre ellos, impiden precisar si estos resultados son debidos a las características peculiares de nuestra población y/o a la heterogeneidad de las poblaciones de los diferentes estudios publicados hasta la fecha.

Concluimos que, en la población canina sana objeto de nuestro estudio, la disminución en el valor relativo de los linfocitos T se ve compensada por una elevación en el porcentaje de los linfocitos NK. En los anteriores estudios referenciados no se expresan

los valores en términos absolutos por lo que no podemos comparar lo que ocurre en nuestra población en números absolutos en relación con el resto de poblaciones estudiadas. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos en nuestra población canina se encuentra dentro de valores fisiológicos, por lo que podemos deducir que efectivamente existe un aumento en el número de linfocitos NK circulantes que compensa la disminución en términos absolutos de linfocitos T, aunque no podemos precisar la significación del aumento de los linfocitos NK en esta población.

5.2.4.2. Subpoblaciones linfocitarias

A continuación pasamos a comparar en las tablas 4 y 5 los valores relativos de las subpoblaciones de linfocitos T observadas por otros autores y en nuestro estudio.

LINFOCITOS Th				
Ac monoclonales empleados	N	MEDIA	DS	REFERENCIA
CD4	12	47,50	8,80	Chabanne <i>et al</i> , 1995
CD4	12	40,00	7,50	Dirscherl <i>et al</i> , 1995
CD4	5	35,00		Caswell <i>et al</i> , 1997
CD4	28	45,00	8,30	Byrne <i>et al</i> , 2000
CD4/TCR$\alpha\beta$	9	39,70	4,26	Guarga <i>et al</i> , 2000
CD4	54	43,20	6,90	Faldyna <i>et al</i> , 2001
CD4	23	40,10	11,40	Duque <i>et al</i> , 2002
CD4	24	40,77	2,040	Winnicka <i>et al</i> , 2002
CD4⁺ CD8⁻	11	42,30	5,90	Sakai <i>et al</i> , 2003
CD4⁺ CD8⁻	18	33,92	5,83	Tesis presentada

TABLA 5.2.4.- Estadísticos básicos de los valores de linfocitos Th definidos en nueve referencias y en la tesis presentada, así como la marcación con anticuerpos monoclonales empleada en cada estudio.

Podemos observar una cierta homogeneidad entre los porcentajes de linfocitos Th obtenidos en los diferentes estudios referenciados, si bien los valores obtenidos en la tesis presentada son inferiores a los de otros estudios.

LINFOCITOS Tc				
Ac monoclonales empleados	N	MEDIA	DS	REFERENCIA
CD8	12	19,30	4,00	Chabanne <i>et al</i> , 1995
CD8	12	19,00	3,60	Dirscherl <i>et al</i> , 1995
CD8	5	14,60		Caswell <i>et al</i> , 1997
CD8	28	28,80	5,60	Byrne <i>et al</i> , 2000
CD8/TCR$\alpha\beta$	9	13,40	3,42	Guarga <i>et al</i> , 2000
CD8	54	19,10	5,70	Faldyna <i>et al</i> , 2001
CD8	23	19,50	7,90	Duque <i>et al</i> , 2002
CD8	24	26,44	1,72	Winnicka <i>et al</i> , 2002
CD4⁻CD8⁺	11	26,30	3,60	Sakai <i>et al</i> , 2003
CD4⁻CD8⁺	18	24,59	7,04	Tesis presentada

TABLA 5.2.5.- Estadísticos básicos de los valores relativos de linfocitos Tc definidos en nueve referencias y en la tesis presentada, así como la marcación con anticuerpos monoclonales empleada en cada estudio.

En cuanto al valor porcentual de los linfocitos Tc en sangre periférica de perros sanos observamos una cierta variabilidad en los datos referidos por distintos autores, con un rango de las medias de 13,4 (Guarga *et al*, 2000) a 28,8 (Byrne *et al*, 2000). Nuestros valores se encuentran dentro del rango descrito y comprobamos como el valor medio de los linfocitos Tc obtenidos en los dos únicos estudios en los que se emplea la asociación de dos anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 (Sakai *et al*, 2003; Tesis presentada) son muy próximos (26,30 y 24,59, respectivamente).

En relación con la tercera subpoblación linfocitaria, hay que destacar la escasez de estudios que evalúen la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ en perros. En humanos las células T $\gamma\delta$ representan sólo del 0,5 al 15% de los linfocitos T circulantes (Roitt, 1998a; Caldwell *et al*, 1995), mientras que en rumiantes representan del 30 al 80% (Roitt, 1998a). Un único estudio publicado refiere, en una población de 12 perros, un valor medio de $2,1 \pm 1,5\%$ de la población linfocitaria (Faldyna *et al*, 2001), mientras que otras fuentes (Sonea *et al*, 2000) citan estudios no publicados que estiman unos valores circulantes de linfocitos T $\gamma\delta$ en perros sanos del 1 al 4% de los leucocitos totales (trabajos no publicados de Sonea y Moore, citados por Sonea *et al*, 2000).

En nuestra investigación, el valor porcentual medio para los linfocitos T $\gamma\delta$, referido a población linfocitaria, es del 14,39%, referido a la población de linfocitos T es del 19,61% y referido a la población de leucocitos es del 3,63%. Nuestras observaciones en perros sanos son similares a las de Sonea *et al*, si bien los porcentajes son muy superiores a los de Faldyna *et al*.

En cuanto a los valores obtenidos en otras especies como humanos y rumiantes, observamos que, según nuestro estudio, el número de linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentra entre los de ambas especies. Aunque los valores de nuestra población sana son un paso previo imprescindible para el estudio de la influencia de la ehrlichiosis sobre el perfil inmunofenotípico de los animales afectados, sería interesante realizar más estudios que determinen las distintas poblaciones leucocitarias en animales sanos.

ÍNDICE LINFOCITARIO CD4/CD8				
CD4/CD8	N	MEDIA	DS	REFERENCIA
CD4/CD8	12	2,60	0,80	Chabanne <i>et al</i> , 1995
CD4/CD8	12	2,20	0,30	Dirscherl <i>et al</i> , 1995
CD4/CD8	15	1,70		Rivas, 1995
CD4/CD8	5	2,80		Caswell <i>et al</i> , 1997
CD4/CD8	28	1,87		Byrne <i>et al</i> , 2000
CD4/CD8	9	3,13	0,830	Guarga <i>et al</i> , 2000
CD4/CD8	54	2,50	0,90	Faldyna <i>et al</i> , 2001
CD4/CD8	29	2,14		Gebhart y Carter, 1992
CD4/CD8	11	1,64	0,36	Sakai <i>et al</i> , 2003
CD4/CD8	18	1,48	0,45	Tesis presentada

TABLA 5.2.6.- Estadísticos básicos de los valores del índice linfocitario CD4/CD8 definidos en nueve referencias y en la tesis presentada.

Los valores obtenidos en nuestro estudio para el índice linfocitario CD4/CD8 son los más bajos de todos los encontrados en la bibliografía consultada; este hecho puede explicarse por el valor comparativamente inferior de linfocitos Th (linfocitos CD3⁺ CD4⁺) encontrado en nuestro estudio en comparación con el resto de referencias.

Las diferencias observadas en el fenotipo de nuestros perros sanos, en comparación con otras poblaciones caninas, pueden ser debidas a lo novedoso de nuestra investigación al trabajar con un tipo de colectividad canina no estudiada en este aspecto hasta la fecha. Las condiciones de vida de nuestra población están sujetas a condiciones de estrés, hacinamiento y competitividad no existentes en otros colectivos. Del mismo modo que, en otros estudios se han encontrado diferencias etarias y raciales (Greeley *et al*, 1996; Byrne *et al*, 2000), las condiciones de vida de los animales podrían condicionar el perfil inmunofenotípico (inmunológico).

En este sentido, diversos autores han observado la inversión del índice CD4/CD8 en perros que habitaban en las proximidades de vertederos (Backer *et al*, 1993).

Resumiendo, en nuestra población control de perros sanos encontramos un valor inferior en el porcentaje de linfocitos T comparado con los valores obtenidos por otros investigadores. La reducción en el porcentaje de esta población linfocitaria se produce por una disminución de los valores de linfocitos Th en la población estudiada, lo que conlleva a la disminución del índice linfocitario CD4/CD8. Si bien el índice CD4/CD8 se encuentra en valor inferior en la población de nuestro estudio, no existe una inversión del mismo, ya que el valor porcentual de linfocitos Th sigue encontrándose por encima del de linfocitos Tc, por lo que la posibilidad de que exista una disfunción inmunológica en esta población es baja.

Por otra parte, hemos observado como los valores de las poblaciones linfocitarias de perros sanos son muy variables, dependiendo del estudio consultado. Ante este hecho y la ausencia de la estandarización del inmunofenotipo en animales sanos, coincidimos con lo ya apuntado por otros autores (Faldyna *et al*, 2001) en la necesidad del estudio inmunofenotípico de un grupo control lo más semejante posible a la población objeto de estudio, previamente a cualquier investigación.

5.3 POBLACIÓN CON EHRLICHIOSIS

En nuestro estudio, la población canina con ehrlichiosis se caracterizó por la presencia de un título de anticuerpos frente a *E. canis* por encima de 1/80 y por la ausencia de sintomatología detectable a la exploración.

Se sabe que un título elevado de anticuerpos aparece durante la enfermedad, pero que también permanece durante tiempo prolongado tras el tratamiento (Perille y Matus, 1991; Bartsch y Greene, 1996; Harrus *et al*, 1996a; Frank y Breitschwerdt, 1999; Sainz *et al*, 2000a). En nuestra investigación, todos los animales llevaban más de nueve meses en la

protectora y no habían sido tratados previamente con fármacos frente a ehrlichiosis, por lo que podemos afirmar que los perros objeto de este estudio se encontraban muy probablemente en la fase subclínica de la enfermedad.

5.3.1 HEMATOLOGÍA: ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS

No existe variación en el número de glóbulos rojos ni en el hematocrito en los perros con ehrlichiosis ni respecto a valores fisiológicos (Meinkoth, 2000), ni respecto a los valores encontrados en la población control. Aunque se pueda apreciar un descenso en los valores medios de la concentración de hemoglobina y de los índices eritrocitarios (HCM, VCM y CHCM) en los animales con ehrlichiosis respecto a la población control, estos valores se encuentran dentro de los valores considerados como normales para la población canina. Concluimos que en los perros con ehrlichiosis estudiados, las variables de la serie roja estudiadas se encuentran dentro del rango de la normalidad, aún admitiendo que en un solo animal se podría considerar la existencia de una ligera anemia ($4,57 \times 10^6$ GR/ μ l, HB<12, Htc=35).

Se ha descrito la existencia frecuente de anemia en animales con ehrlichiosis sintomáticos (Troy *et al*, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988). Otros autores que han incluido en su estudio animales sintomáticos y asintomáticos reflejan una incidencia de anemia ligeramente inferior (Sainz, 1996). En nuestro trabajo, caracterizado por la inclusión de perros con ehrlichiosis subclínica se comprueba la ausencia de anemia en estos animales, hecho que corrobora los hallazgos de otros autores en ehrlichiosis canina subclínica (Codner y Farris-Smith, 1986).

Por otra parte, en tres animales se observaron valores mayores de lo normal en los tres parámetros indicadores de la serie roja, lo que puede estar directamente relacionado con el estado de excitación de los animales en el momento de la extracción.

5.3.2 PLAQUETAS

La alteración hematológica más frecuentemente descrita en la ehrlichiosis canina es la trombocitopenia, habiendo sido muy empleada su presencia como dato previo para la sospecha de ehrlichiosis en perros (Woody y Hoskins, 1991). Esto, si cabe, ha hecho que su presentación haya sido sobreestimada, existiendo estudios en los que se describe trombocitopenia en el 100% de los animales estudiados (Troy *et al*, 1980). Otros estudios sugieren incidencias del 80% de los casos (Waddle y Littman, 1988; Sainz y Tesouro, 2001). En nuestro estudio hemos observado la existencia de trombocitopenia en torno a un 35% de los animales estudiados, porcentaje muy inferior a lo reseñado en estudios anteriores.

Concluimos que, admitiendo que la trombocitopenia es la alteración hematológica aparecida más frecuentemente en perros con ehrlichiosis, en la fase subclínica de la enfermedad su presentación disminuye considerablemente, si bien sigue siendo ésta una de las pocas alteraciones que se pueden encontrar en animales con ehrlichiosis en fase subclínica y de hecho podemos comprobar como el valor medio del recuento de trombocitos en grupo el grupo control es un 50% mayor que en el grupo de perros con ehrlichiosis.

Por otro lado señalamos la ausencia de sintomatología hemorrágica en presencia de trombocitopenia, hecho que ya ha sido observado por otros autores y que, unido a la presencia de hemorragia en ausencia de trombocitopenia, sugiere que las principales responsables de esta sintomatología son alteraciones en la funcionalidad plaquetaria (Kuehn y Gaunt, 1985; Woody y Hoskins, 1991; Sainz y Tesouro, 2001).

La única correlación encontrada entre los valores plaquetarios y las distintas poblaciones y subpoblaciones leucocitarias en animales con ehrlichiosis subclínica ha sido una relación inversa con el porcentaje de células NK, relación no existente en el grupo Control. Sin embargo, ello no nos permite definir la trombocitopenia como indicador de alteraciones inmunológicas en el curso de la ehrlichiosis.

5.3.3 PROTEÍNAS SÉRICAS

La hiperproteinemia es un hallazgo destacado en casos de ehrlichiosis canina, habiéndose descrito su presencia en todas las fases de la enfermedad (Burghen *et al*, 1971; Buhles *et al*, 1974; Weisiger *et al*, 1975; Troy *et al*, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Davoust *et al*, 1991a; Davoust *et al*, 1991b; Weiser *et al*, 1991). En nuestro estudio hemos observado hiperproteinemia acompañada de hiperglobulinemia en torno a un 40% de los casos estudiados, porcentaje muy similar al observado en otros estudios que describen frecuencias del 30-40% de los casos (Troy *et al*, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988). Nuestros resultados confirman que, en la fase subclínica, es frecuente la aparición de hiperproteinemia por hiperglobulinemia (Ghorbel *et al*, 1993b, Sainz y Tesouro, 2001). Algo similar ocurre en fases crónicas en las que se ha llegado a observar presencia de hiperglobulinemia en el 100% de los perros infectados (Weiser *et al*, 1991) debido a la cronicidad de la infección.

La causa de la hiperglobulinemia puede ser la existencia de una respuesta inmunitaria humoral exacerbada e inefectiva (Woody y Hoskins, 1991). En relación a esta cita, resulta curioso que no se observen correlaciones directas entre los valores de linfocitos B y la concentración de globulinas séricas y sin embargo, si aparece una relación directa entre éstos y la concentración de albúmina sérica. Además, las globulinas séricas en los animales con ehrlichiosis presentan una significativa correlación directa con los valores tanto absolutos como relativos de linfocitos T y Tc. De esta manera el índice Albúmina/Globulinas se encuentra, de manera paradójica, en relación indirecta con los valores de linfocitos T y Tc y directa con los valores de linfocitos B. Estas correlaciones no son observables en los perros pertenecientes al grupo Control. Desconocemos la significación exacta de estos hallazgos, pero consideramos que pueda ser indicativo de la alteración de los mecanismos inmunitarios en el curso de la ehrlichiosis canina, aún a pesar de que la presencia de estas observaciones pueda ser simplemente atribuida al propio curso de la enfermedad, es decir que sólo presenten un relación temporal.

Sólo en tres casos hemos observado hipoproteinemia, asociándose a hipoalbuminemia. Este hecho concuerda con los resultados de otros autores que describen su aparición de manera esporádica en la fase subclínica de la enfermedad (Kuehn y Gaunt, 1985; Sainz, 1996).

La hipoalbuminemia ha sido descrita en fases agudas y crónicas de la infección, habiéndose sugerido su desaparición en la fase subclínica (Davoust *et al*, 1991b). Sin embargo, en nuestro estudio, con población incluida en esta fase, hemos observado una prevalencia en torno al 40%. Esta prevalencia ya ha sido registrada por otros autores (Khuen y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988) que incluían animales en distintas fases de la infección. En los animales del grupo control no se ha observado la existencia de hipoalbuminemia, por lo que este proceso no es una característica del colectivo de procedencia, sino que es una alteración probablemente condicionada por la infección. En nuestro trabajo, por tanto, constatamos que la hipoalbuminemia es una alteración frecuente en la fase subclínica de la infección y que puede ser un indicador de la presencia de patologías renales subclínicas por depósito de inmunocomplejos (Breitschwerdt *et al*, 1987; Breitschwerdt, 2002).

Por último, los resultados señalados respecto a los valores de globulinas y albúmina hacen que en torno a un 75% de los animales presenten una alteración del cociente Albúmina/Globulinas. Haciendo que la disproteínia sea la alteración biopatológica más frecuentemente observada en esta fase de la enfermedad y en este estudio.

5.3.4. RECuento DE LEUCOCITOS

En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en el número de leucocitos en sangre periférica entre las poblaciones de perros sanos y de perros con ehrlichiosis incluidas en la investigación.

El número de leucocitos circulantes es considerado uno de los parámetros más variables en el curso de la ehrlichiosis canina (Hibler *et al*, 1986; Woody y Hoskins, 1991). Así, se ha descrito leucopenia moderada en los estados iniciales de la infección (Buhles *et al*, 1974; Reardon y Pierce, 1981) y más grave en la fase crónica de la enfermedad (Taylor *et al*, 1941; Woldehiwet y Scott, 1982a; Woldehiwet y Scott, 1982b; Whist *et al*, 2002). También se puede presentar leucocitosis posteriormente a la leucopenia de fase aguda (Kuehn y Gaunt, 1985; Hibler *et al*, 1986; Waddle y Littman, 1988).

En nuestro estudio, la mayoría de los animales con ehrlichiosis presentaban un recuento leucocitario dentro del rango fisiológico (sólo en 3 perros se detectó leucocitosis ligera), lo que coincide con los hallazgos de otros autores (Sainz *et al*, 2000c). La normalidad del recuento leucocitario en la población de nuestro estudio puede estar relacionada con la afirmación de que esta población se encuentra en la fase subclínica de la enfermedad.

5.3.5. RECUENTO DIFERENCIAL DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS

En el curso de la ehrlichiosis canina se ha referido fundamentalmente la existencia de leucopenia con neutropenia y linfopenia. Estas citopenias se han descrito en el curso de la infección experimental en los primeros días de la infección, produciéndose a continuación la recuperación de los valores normales (Woldehiwet, 1991) o incluso una posterior linfocitosis con presencia de linfocitos granulares grandes (Lilliehöök *et al*, 1998) hacia el día 13-16 post-infección. Unos autores describen una mayor frecuencia de presentación de linfopenia absoluta que de linfocitosis absoluta en perros con ehrlichiosis (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988), mientras que otros observan lo contrario (Sainz, 1996). Se considera que la linfopenia es más característica de las fases crónicas y más graves de la enfermedad y que es producida por una hipoplasia medular (Hibler *et al*, 1986). La discrepancia existente entre las diferentes observaciones puede ser debido al estudio de individuos en distintas fases de la enfermedad.

En la presente investigación existieron diferencias significativas en el recuento porcentual de **neutrófilos** entre ambas poblaciones del estudio, produciéndose una disminución muy significativa en los valores relativos de neutrófilos, que no en los absolutos, en la población canina con ehrlichiosis.

El análisis estadístico de los valores de los **linfocitos** indica diferencias muy significativas entre las dos poblaciones estudiadas. La población linfocitaria sufre un importante incremento en la población con ehrlichiosis canina en comparación con los animales control y este incremento se manifiesta tanto en el recuento relativo como absoluto, tal y como señalan otros autores (Sainz *et al*, 2000c).

El incremento del recuento porcentual de linfocitos y la disminución del de neutrófilos hacen que en muchos de los perros con ehrlichiosis se encuentren fórmulas invertidas, llegándose a observar recuentos linfocitarios de hasta el 68% del total de glóbulos blancos. La inversión de la fórmula leucocitaria en ausencia de una neutropenia absoluta ya ha sido descrita por otros autores en el curso de la ehrlichiosis canina (Sainz, 1996).

Como ya hemos comentado anteriormente, en la bibliografía se describe tanto la presencia de linfopenia y neutropenia como de linfocitosis y recuentos normales de neutrófilos. Teniendo en cuenta las diferentes fases de la enfermedad, podemos decir que nuestros resultados describen el perfil leucocitario en perros con ehrlichiosis en la fase subclínica de la enfermedad. Así pues, la fase subclínica de la ehrlichiosis canina se podría caracterizar por la existencia de linfocitosis, neutropenia relativa y por la disminución del índice neutrófilos/linfocitos. El hecho de encontrar otros estudios en los que la principal característica de la enfermedad es la presencia de linfopenia nos conduce a pensar que muchos de los casos incluidos en dichos estudios se encuentran en las fases aguda y crónica de la enfermedad.

Recuentos de neutrófilos y linfocitos

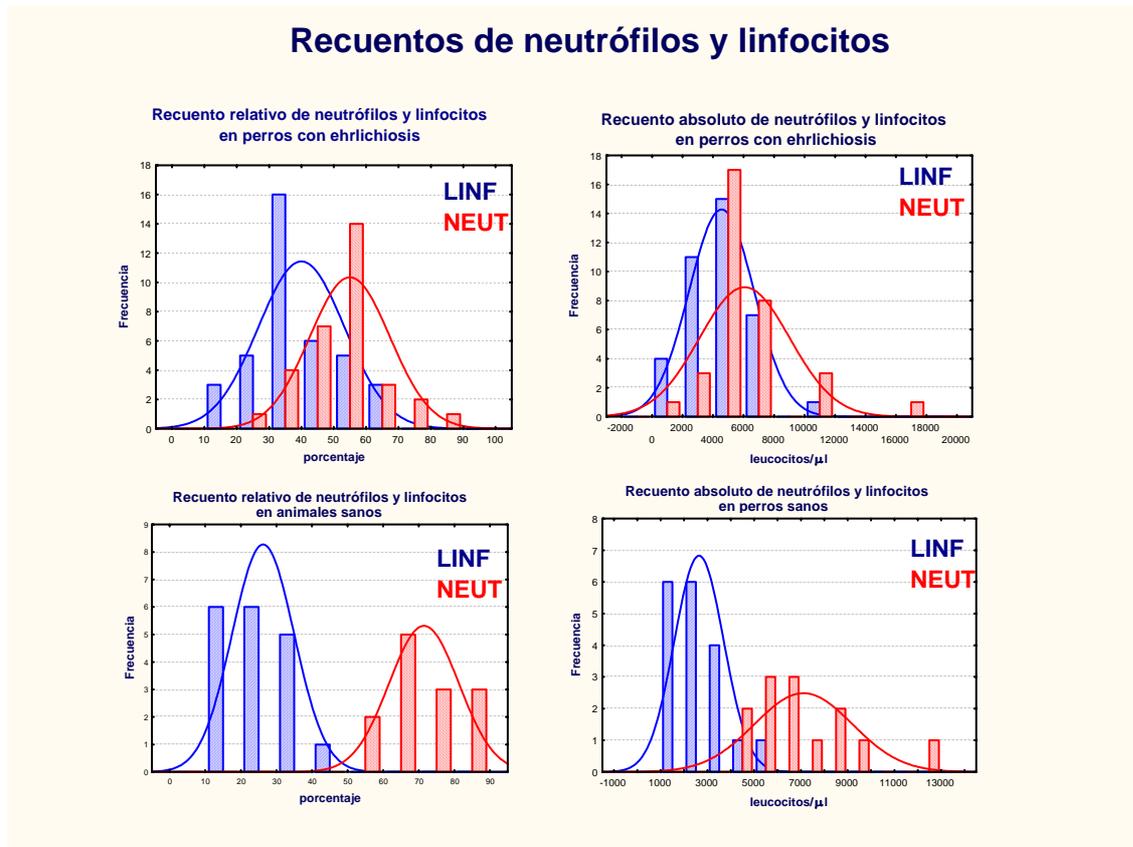


GRAFICO. 5.3.5.1 - En estas gráficas se observa cómo tanto el recuento de neutrófilos en valores absolutos como relativos se desplaza hacia la izquierda, es decir, sufre una disminución en sus valores en los perros con ehrlichiosis al compararlo con los valores en animales sanos. De la misma manera, los valores linfocitarios se desplazan hacia la derecha, es decir, incrementan su valor. Esto supone un solapamiento de ambos valores y una tendencia a la inversión de la fórmula leucocitaria.

En la leishmaniosis canina, enfermedad producida por un protozoo intracelular, se estima una mayor resistencia a la infección en presencia de una respuesta inmunológica de tipo celular, apareciendo la enfermedad en caso de que esta respuesta no se genere (Carvalho *et al*, 1985). En leishmaniosis se ha observado la existencia de linfopenia en el curso de la enfermedad sintomática, siendo esta linfopenia más acusada cuanto peor sea la condición física del individuo (Keenan *et al*, 1984; Martínez-Moreno *et al*, 1995). Por el contrario, la existencia de linfocitosis se ha descrito en animales asintomáticos (Bourdoiseau *et al*, 1997) y durante el tratamiento de la enfermedad (Caldwell *et al*, 1995). El hecho de que en nuestro estudio con animales asintomáticos con ehrlichiosis destaque la

existencia de linfocitosis podría sugerir la existencia de un cierto paralelismo en cuanto a la población linfocitaria presente en ehrlichiosis y leishmaniosis.

Los valores de **monocitos** se mantienen estables entre las dos poblaciones objeto de estudio. Su análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre animales sanos y con ehrlichiosis, al contrario de lo mostrado en algunos estudios en los que se describía la existencia de monocitopenias (Kuehn y Gaunt, 1985; Sainz *et al*, 2000c) y otros en los que se detalla la existencia de monocitosis absolutas (Troy *et al*, 1980; Waddle y Littman, 1988).

Mientras que la mayoría de los autores coincide en la existencia de eosinopenia en el curso de la ehrlichiosis canina (Waddle y Littman, 1988; Woody y Hoskins, 1991; Sainz, 1996), en nuestro estudio no se aprecian diferencias significativas en los valores de **eosinófilos** entre perros con y sin ehrlichiosis, aunque los valores se encuentran ligeramente disminuidos en la población infectada.

La presencia de recuentos normales de monocitos y eosinófilos en perros con ehrlichiosis en nuestro estudio puede ser debido a lo ya comentado para las otras poblaciones leucocitarias, es decir, al hecho de encontrarnos ante una población con ehrlichiosis en fase subclínica. En esta fase podrían recuperarse los valores fisiológicos de los recuentos sanguíneos, que se encuentran disminuidos tanto en la fase aguda como en la crónica.

Otra posible explicación puede ser que, como es bien sabido, en condiciones normales, las poblaciones de monocitos y eosinófilos presentan valores bajos y, puesto que el recuento se realiza sobre 100 leucocitos, puede ser complicado precisar la existencia de citopenias en estas poblaciones. Tal vez estas observaciones deberían ser valoradas incrementando el número de leucocitos sobre los que se realiza la observación.

5.3.6. POBLACIONES LINFOCITARIAS: INMUNOFENOTIPO

5.3.6.1. Poblaciones linfocitarias

En nuestro estudio se observa un incremento de los valores relativos de **linfocitos T** en los perros con ehrlichiosis que, acompañado de la linfocitosis presente, hace que el número de linfocitos T circulantes manifieste un aumento muy marcado.

La leishmaniosis, como hemos comentado previamente, parece presentar semejanzas inmunológicas con la ehrlichiosis canina. Sin embargo, en el curso de leishmaniosis, diversos autores han constatado la existencia de una disminución de la población de linfocitos T (Moreno *et al*, 1999; Bourdoiseau *et al*, 1997).

Si comparamos los resultados de un estudio realizado sobre dos grupos de perros con leishmaniosis, uno asintomático y otro sintomático, se observa un incremento en el número de linfocitos T (2185 ± 915) en los animales asintomáticos respecto al grupo Control (1800 ± 875), mientras que en el grupo sintomático se produce una clara disminución (1130 ± 700) (Bourdoiseau *et al*, 1997). Haciendo un paralelismo con nuestra investigación y considerando el análisis de perros en fase subclínica de ehrlichiosis, estos resultados se ajustan a los obtenidos por nosotros y nos inducen a sugerir que la distribución de las poblaciones linfocitarias a lo largo de las distintas fases de la enfermedad no es constante.

En ehrlichiosis también se ha asociado una linfocitosis T con el intento de recuperación de la infección (Everett *et al*, 1994; Caldwell *et al*, 1995), como parece suceder en los perros con Ehrlichiosis subclínica, como demuestran nuestros resultados.

En nuestro estudio, los valores porcentuales de **linfocitos B** se encuentran marcadamente disminuidos en los animales con ehrlichiosis. Sin embargo, este hecho no se refleja en sus valores absolutos debido a la linfocitosis existente. Podemos afirmar que la disminución porcentual de linfocitos B obedece más a un incremento de otras poblaciones

linfocitarias que a su verdadera reducción numérica, es decir, se trataría de una disminución relativa que, sin embargo, mantiene constante el número total de linfocitos B circulantes.

La gran cantidad de anticuerpos circulantes en el curso de la ehrlichiosis canina y el aumento de las globulinas séricas podría hacer pensar en un incremento del número de linfocitos B circulantes, considerándose su disminución o mantenimiento como un hallazgo paradójico, tal y como otros autores han sugerido en el caso de la leishmaniosis (Keenan *et al*, 1984; Slappendel, 1988; Pinelli *et al*, 1994). Sin embargo, en el curso de la leishmaniosis, en la que también existe hiperglobulinemia, se ha observado a su vez la disminución en el valor absoluto de los linfocitos B (Bourdoiseau *et al*, 1997).

La ausencia de un incremento esperado de los linfocitos B en sangre podría explicarse porque:

1.- La producción de anticuerpos se produce en células plasmáticas, escasas en sangre circulante, y distribuidas principalmente en nódulos linfáticos, placas de Peyer, folículos esplénicos y médula ósea (Keenan *et al*, 1984). Por ello, no tiene por qué producirse un incremento en la población de linfocitos B circulantes en presencia de hiperglobulinemia.

2.- La producción de anticuerpos frente a una estimulación antigénica de globulinas obedece a una expansión clonal de linfocitos B, que no tiene por qué producir un incremento en su población total, sino un reajuste en la misma.

Ambos supuestos podrían explicar la inversión de la correlación estadística entre el número tanto relativo como absoluto de linfocitos B y las globulinas. Su correlación directa con la albúmina continua sin explicarse, pero tal vez es una asociación consecutiva a la propia patocronia de la ehrlichiosis más que a que los mecanismos desencadenantes de uno y otro estén implícitamente involucrados, tal y como apuntábamos en el apartado 5.3.3.

Según nuestros resultados, en los perros con ehrlichiosis, los **linfocitos NK** sufren un descenso porcentual estadísticamente significativo con respecto a la población sana. Aunque este descenso también se refleja en los recuentos absolutos, debido a la linfocitosis existente, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas.

Los linfocitos NK son fuente conocida de IFN- γ , citoquina que interviene en la activación macrofágica y la destrucción de las ehrlichias intracelulares por los macrófagos (Scharton y Scott, 1993). Tal vez un incremento en esta población reflejaría una activación de los mecanismos macrofágicos de destrucción bacteriana (Park y Rikihisa, 1992), mecanismos defensivos innatos que se ponen en marcha en las primeras fases de un proceso infeccioso. Por ello, en la fase aguda de la enfermedad se podría observar un aumento de esta población que, sin embargo, disminuiría posteriormente en la fase subclínica de la enfermedad. Las variaciones observadas en nuestro estudio pueden ser, por tanto, un reflejo de la ineficaz respuesta inmunológica producida, que no es capaz de inducir la destrucción de las ehrlichias en el interior de los macrófagos. En cualquier caso, a conocimiento del autor, no existen estudios sobre el papel de los linfocitos NK en el curso de la ehrlichiosis.

Por otra parte, como ya habíamos señalado anteriormente los valores porcentuales de linfocitos NK presentan una relación directa con los valores plaquetarios, lo que podría interpretarse como que en la fase subclínica de la ehrlichiosis una ausencia de disminución de los valores relativos de NK es un signo de buen valor pronóstico, al igual que lo es la ausencia de trombocitopenia.

En la observación de los frotis sanguíneos para la realización del recuento diferencial leucocitario, se pudo constatar la existencia de linfocitos de tamaño mayor de lo normal, que podríamos considerar linfocitos granulares grandes, si bien no se realizó un recuento sistemático de esta población. No obstante, se constató la existencia de este tipo celular en la mayoría de los perros con ehrlichiosis. Esta linfocitosis granular ha sido descrita por otros autores en el curso de la ehrlichiosis canina (Weisser *et al*, 1991; Heeb *et al*, 2003). Como ya se describió en el capítulo de inmunopatogenia, los linfocitos granulares grandes

pueden ser células NK o linfocitos T. Dado que en nuestro estudio el porcentaje de NK se encuentra disminuido respecto a la población control, cabe deducir que esta población de linfocitos granulares grandes estará representado mayoritariamente por linfocitos CD3⁺.

Los individuos afectados por ehrlichiosis pueden ser capaces de superar la infección con una respuesta celular adecuada tras la fase aguda (Madigan *et al*, 1990). Experimentalmente, se ha demostrado la importancia de la inmunidad celular en la resistencia frente a la ehrlichiosis (Liew, 1989). Cuando la respuesta celular no es adecuada, la enfermedad progresa a la fase subclínica durante la que el organismo intentará desarrollar mecanismos de defensa encaminados a la superación de la infección. De los datos de nuestra investigación se deduce que la respuesta celular de los perros en fase subclínica puede dar lugar a una linfocitosis como consecuencia del aumento de los linfocitos T circulantes. Por ello, a continuación pasamos a analizar lo que ocurre a nivel de las subpoblaciones de linfocitos T en esta fase subclínica.

5.3.6.2. Subpoblaciones linfocitarias

Si bien los valores porcentuales de **linfocitos Th** o cooperadores sufren un descenso significativo en perros con ehrlichiosis, sus valores absolutos se ven incrementados, motivados por la linfocitosis que presentan estos animales.

Se considera que la incompetencia de la inmunidad celular es consecuencia de una disminución de los linfocitos Th (Moreno *et al*, 1999). Así, un descenso de la población de linfocitos Th parece representar un estado de inmunosupresión latente en diferentes infecciones no sólo bacterianas, sino también protozoarias como la leishmaniosis (Guarga *et al*, 2000; Guarga *et al*, 2002; Moreno *et al*, 1999) y víricas como el SIDA en humanos (Williams *et al*, 1983) o el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) en gatos (Novotney *et al*, 1990; Tompkins *et al*, 1991). También se ha señalado recientemente la importancia de los linfocitos Th en la eliminación de las infecciones ehrlichiales (Ganta *et al*, 2004).

En el caso de la leishmaniosis visceral, tanto humana (Cenini *et al*, 1993) como canina (Bourdoiseau *et al*, 1997; Moreno *et al*, 1999; Guarga *et al*, 2000), se produce una disminución importante en esta población, observándose que cuanto menor es el recuento de linfocitos Th, mayor es la capacidad infectiva del animal, valorada a través de xenodiagnóstico directo (Guarga *et al*, 2000). No obstante, el mecanismo responsable de esta disminución no se ha podido aclarar. Se ha especulado que puede responder a la disminución de células T en zonas primarias de linfocitos T como nódulos linfáticos, tonsilas y corteza del timo, que se encuentran infiltradas con macrófagos, muchos de ellos infectados (Carvalho *et al*, 1985 y Keenan *et al*, 1984). Otra posibilidad es que la disminución de linfocitos Th en sangre sea consecuencia de su migración a otros órganos (Guarga *et al*, 2000).

El tratamiento de la leishmaniosis canina induce una recuperación de las células Th, lo que confirma la importancia de esta subpoblación linfocitaria en la lucha frente a la enfermedad (Moreno *et al*, 1999). Por el contrario, la población de linfocitos Tc muestra una distribución similar antes y después del tratamiento (Moreno *et al*, 1999; Guarga *et al*, 2002). Estas observaciones indican la importancia de la inmunidad celular en la protección frente a *Leishmania infantum* en perros.

Por otro lado, y también en el caso de la leishmaniosis canina, se ha apreciado que la disminución en la población de linfocitos Th sólo se registra en los animales con sintomatología y no se produce en animales asintomáticos. En estos perros asintomáticos incluso se llega a observar un aumento del número de linfocitos Th (1210 ± 615) respecto de los animales control (975 ± 535) (Bourdoiseau *et al*, 1997).

La existencia de una linfocitosis Th absoluta en la fase subclínica de la infección por *Ehrlichia* spp. puede indicar un intento del organismo de superar la infección. Observamos un cierto paralelismo entre los resultados de nuestro estudio y los observados por otros autores en el curso de la leishmaniosis, enfermedad en la que las fases asintomáticas o de recuperación de un tratamiento se caracterizan por un incremento en la población linfocitaria. Sin embargo, este dato hay que tomarlo con cautela ya que los valores

relativos de linfocitos Th en los animales de nuestro estudio se encuentran reducidos (debido al notable incremento de los linfocitos Tc), lo que puede indicar una lucha entre el sistema inmunitario y el agente infeccioso que más tarde podría desembocar en la recuperación espontánea o bien en la cronicidad del proceso (Greene y Harvey, 1984; Madigan *et al*, 1990; Reddy *et al*, 1998; Artursson *et al*, 1999). De hecho, en 5 animales el índice CD4/CD8 está por encima de 1,5 y en 10 está por encima de 1. Tal vez estos animales podrían representar la población con capacidad para superar la infección de forma espontánea, si bien serían necesarios nuevos estudios en los que se valorara la evolución de la infección a largo plazo, tras la fase subclínica.

El incremento de linfocitos Th también se esperaría observar en la fase de resolución tras el tratamiento, mientras que en nuestro estudio este incremento ya se constata en la propia fase subclínica, pudiendo indicar la tendencia a la recuperación que así hemos sugerido.

Otro aspecto a considerar en el futuro debe ser el estudio de las subpoblaciones de linfocitos Th y su participación en los mecanismos inmunitarios desarrollados durante las infecciones ehrlichiales. En nuestro trabajo, el importante incremento de la población de linfocitos Tc podría indicar una respuesta gobernada prioritariamente por la subpoblación Th1.

Los **linfocitos Tc** experimentan un incremento altamente significativo tanto en su recuento porcentual como absoluto, el doble a nivel relativo y más del triple de Tc a nivel de número total de linfocitos circulantes. Si consideramos las subpoblaciones de linfocitos T en valores porcentuales en relación a los linfocitos T, observamos la existencia de un marcado aumento de la población de linfocitos Tc a costa de la disminución de las poblaciones de linfocitos Th y $T\gamma\delta$.

En leishmaniosis visceral humana se han encontrado valores de linfocitos Tc tanto aumentados (Cillari *et al*, 1988) como invariables (Cenini *et al*, 1993) respecto a individuos sanos. En la leishmaniosis canina se ha observado el incremento de esta

población (Bourdoisseau *et al*, 1997, Moreno *et al*, 1999, Guarga *et al*, 2000), habiendo sugerido diversos autores la participación de los linfocitos Tc en la protección frente a leishmaniosis (Titus *et al*, 1985; Hill *et al*, 1989; Müller *et al*, 1991; Pinelli *et al*, 1994; Pinelli *et al*, 1995). Sin embargo, otros autores consideran que los linfocitos Tc no participan en la defensa frente a infección por *Leishmania infantum* (Guarga *et al*, 2000). Se ha observado *in vitro* que una disminución de los linfocitos CD8 no restaura la respuesta frente a *Leishmania* spp. (Sacks *et al*, 1987; Carvalho *et al*, 1985; Moreno *et al*, 1999).

Concluimos que en nuestra investigación la linfocitosis observada en el curso de la ehrlichiosis subclínica es consecuencia directa de un incremento en la población de linfocitos Tc, lo cual viene refrendado por la existencia de correlaciones directas entre los valores de linfocitos Tc, de linfocitos T y de linfocitos y la correlación inversa entre porcentaje de linfocitos Tc y de linfocitos B, entre número de linfocitos T y Tc y porcentaje de linfocitos B y, por último, entre porcentaje de linfocitos T y Tc y número de linfocitos B. Puesto que se desconoce el papel exacto que puede tener esta población en el desarrollo de la enfermedad o en la protección frente a la infección por ehrlichiosis, sería interesante valorar dicha población linfocitaria en otras fases de la enfermedad.

Los **linfocitos T $\gamma\delta$** , sufren un descenso relativo aunque no significativo respecto a la población control. Deberíamos tal vez considerar que la población control de partida presenta valores de linfocitos T $\gamma\delta$ superiores a los clásicamente aceptados, por lo que los hallazgos descritos en el curso de la ehrlichiosis por otros autores respecto a esta subpoblación linfocitaria, debe ser comparado con cautela.

Por otra parte la variación en los porcentajes de esta la población linfocitaria en sangre periférica puede ser un reflejo de cambios en los órganos periféricos de producción y/o de alteraciones en el transporte de estas células entre sangre y dichos órganos (De Rosa *et al*, 2004).

Poco se conoce de las especificidades antigénicas y del papel fisiológico de los linfocitos $T\gamma\delta$ (Caldwell *et al*, 1995), aunque parece que poseen amplia citotoxicidad frente a células tumorales y frente a células autólogas infectadas con microorganismos intracelulares (Caldwell *et al*, 1995). También se han asociado con la inducción de respuesta inmune humoral que incluye la secreción de altos niveles de BCGF (*B cell growth factor*) y BCDF (*B cell differentiation factor*) implicados en el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (Raziuddin *et al*, 1992).

Como ya se ha reseñado previamente, se ha descrito la presencia de linfocitos granulares grandes (LGL) junto con linfocitosis en perros con infección por *E. canis* (Weiser *et al*, 1991) y en personas con infección por *E. chaffeensis* (Caldwell *et al*, 1995). En ehrlichiosis humana, la linfocitosis se debe básicamente al aumento de linfocitos $T\gamma\delta$ que expresan CD3, pero son negativos a CD4 y CD8 (hasta un 97% de las células T) (Caldwell *et al*, 1995). Un aumento de células T CD8-, CD4-, también se ha descrito en el curso de la ehrlichiosis en ovejas (Woldehiwet, 1991). Esta elevación de los linfocitos $\gamma\delta$ ha sido descrita por otros autores en el curso de la ehrlichiosis crónica (McDonough y Moore, 2000), así como en leishmaniosis visceral tanto humana (Cenini *et al*, 1993; Raziuddin *et al*, 1992; Russo *et al*, 1993) como canina (Moreno *et al*, 1999).

El aumento de linfocitos $T\gamma\delta$ observado por estos autores podría participar en el aumento de la actividad de los linfocitos B orientada a la producción de anticuerpos específicos anti-*Ehrlichia*, en ausencia de un incremento en la población de linfocitos B circulantes. Sin embargo, en nuestro estudio no se observa este incremento ni correlación entre los valores de linfocitos $T\gamma\delta$ y linfocitos B, ni con alguno de los valores de proteínas séricas, por lo que creemos que, en nuestro caso, podría no existir esta activación de la respuesta humoral al tratarse de una población en fase subclínica, y tal vez con tendencia a la recuperación.

Como consecuencia del marcado incremento de la población de linfocitos Tc, observamos en nuestro estudio una disminución importante de **índice CD4/CD8** en la fase

subclínica de la ehrlichiosis canina. Este hallazgo ha sido descrito por otros autores en el curso de ehrlichiosis (Woldehiwet, 1991; Heeb *et al*, 2003).

Esta inversión del índice CD4/CD8 también ha sido observada en el curso de la leishmaniosis canina (Bourdoiseau *et al*, 1997; Moreno *et al*, 1999; Guarga *et al*, 2000). Las variaciones del índice CD4/CD8 se han empleado como indicadores de inmunomodulación o inmunosupresión en diferentes patologías víricas en hombre y gato (Fahey *et al*, 1984; Novotney *et al*, 1990).

Como se ha referido previamente, la ehrlichiosis produce una respuesta inmune aberrante (Burghen *et al*, 1971; Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al*, 1999). Esta alteración en la respuesta inmunitaria viene caracterizada por la inversión en el índice CD4/CD8 que, en nuestro caso, observamos que es producida por un incremento en la población de linfocitos Tc. Diversos autores expresan la importancia de la detección de los animales en fase subclínica de la infección para evitar el grave desenlace de la enfermedad (Harrus *et al*, 1998b; Harrus *et al*, 1999). Junto a otras alteraciones biopatológicas habitualmente halladas (como la trombocitopenia y la hiperproteinemia), este índice CD4/CD8 podría constituir otro indicador de la presencia de una fase subclínica de ehrlichiosis.

A modo de resumen, en base a los hallazgos de nuestro trabajo y los de otros autores, podemos describir la existencia de una linfopenia en la fase aguda de la enfermedad, seguida de una linfocitosis posterior. Los cambios originados en las poblaciones linfocitarias pueden indicar un pulso entre el agente causal y el sistema inmune que podría dar lugar a la resolución de la enfermedad o a la aparición de la fase crónica con todos sus efectos deletéreos. La elevada proporción de animales asintomáticos en presencia de ehrlichiosis en las colectividades estudiadas puede ser un fiel reflejo de la situación real, en la que una gran cantidad de animales pueden encontrarse afectados, pero sin signos importantes de enfermedad. Hasta el momento, ningún estudio ha abordado cuál es el número de animales con ehrlichiosis que pueden ser capaces de superar la enfermedad. Sería interesante la continuidad de esta línea de investigación de cara a determinar

indicadores a nivel del fenotipo inmunitario que pudieran predecir la evolución de la infección.

5.3.6.3. Correlaciones entre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias con otros parámetros hematológicos

Como se anteriormente ha sido comentado, en nuestra investigación nos pareció interesante conocer si existían asociaciones cuantitativas (dos a dos) entre los parámetros biopatológicos estudiados, en especial las que podrían presentarse con las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. Por ello se calcularon los coeficientes de correlación (r) entre las variables tanto en el grupo Control como en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

Tal y como esperábamos, los resultados de nuestro estudio demostraron un mayor número de correlaciones estadísticamente significativas entre los parámetros biopatológicos en el grupo de perros con Ehrlichiosis (valorados en el momento del diagnóstico), que las obtenidas en el grupo Control.

Parte de estas correlaciones, como igualmente ha sido señalado, se deben a que el tamaño de la muestra del grupo de perros con Ehrlichiosis es mayor y por tanto se requiere un menor valor del coeficiente de correlación para alcanzar una relación significativa. Algunas de estas relaciones podían quedar sugeridas en el grupo Control si bien no podían ser admitidas como significativas.

Por otra parte, como también ha sido comprobado con nuestros resultados, las modificaciones en los distintos parámetros que se presentan en el grupo de perros en fase subclínica de Ehrlichiosis establecen nuevas relaciones entre los mismos o incluso conducen a la pérdida o cambio de signo de algunas relaciones observadas en la población sana del grupo Control.

Nuestro propósito, más que entrar en el estudio de estas posibles modificaciones en las correlaciones, muchas de ellas difícil de interpretar, y que parcialmente han podido ser

explicadas al comparar y discutir los valores de los distintos parámetros obtenidos en el grupo de perros con Ehrlichiosis con respecto al grupo Control, era comprobar la posible existencia de relaciones altamente significativas entre distintas variables y las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, con el fin de obtener posibles indicadores de las mismas, especialmente en el grupo de perros afectados con Ehrlichiosis.

En este sentido, y a partir del análisis de regresión lineal entre distintas variables (entre las que se hubiera constatado una correlación altamente significativa) nos proponíamos obtener la ecuación que nos permitiera calcular el valor de una población o subpoblación linfocitaria conociendo el valor de otra variable, tratándose esta última de un parámetro biopatológico fácilmente valorable.

Entre todas las ecuaciones calculadas, y que no han sido reflejadas en el capítulo de resultados, nos parecen como más relevantes las obtenidas entre el número absoluto de linfocitos para estimar el número absoluto de linfocitos T y dentro de estos el número de los linfocitos Tc y Th, y que por su aplicación presentamos en este capítulo de discusión y recogemos en los siguientes tablas.

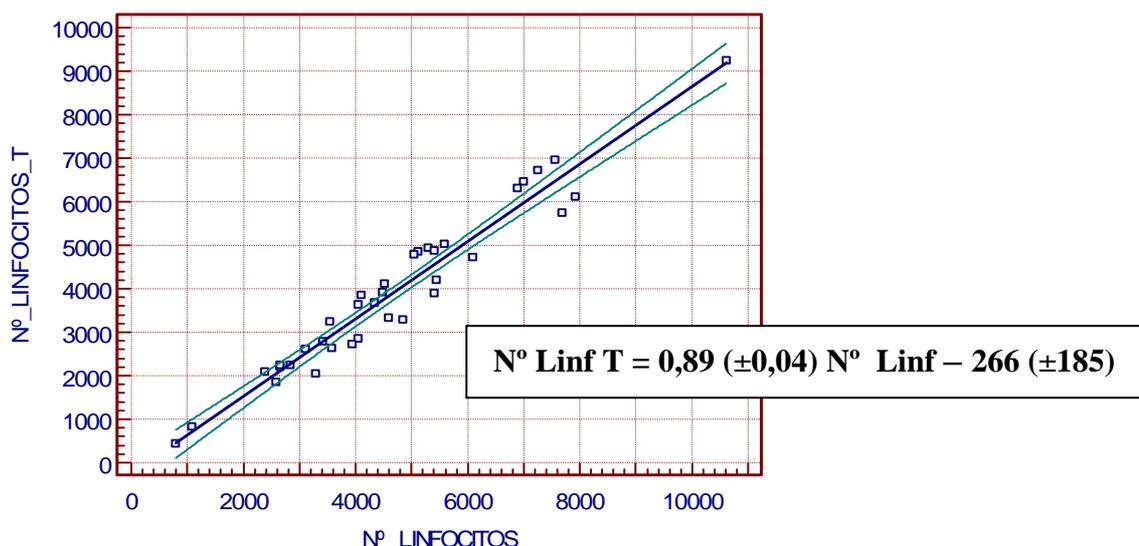


Tabla. 5.3.6.3.1. Regresión lineal entre el número de linfocitos y el número de linfocitos T en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

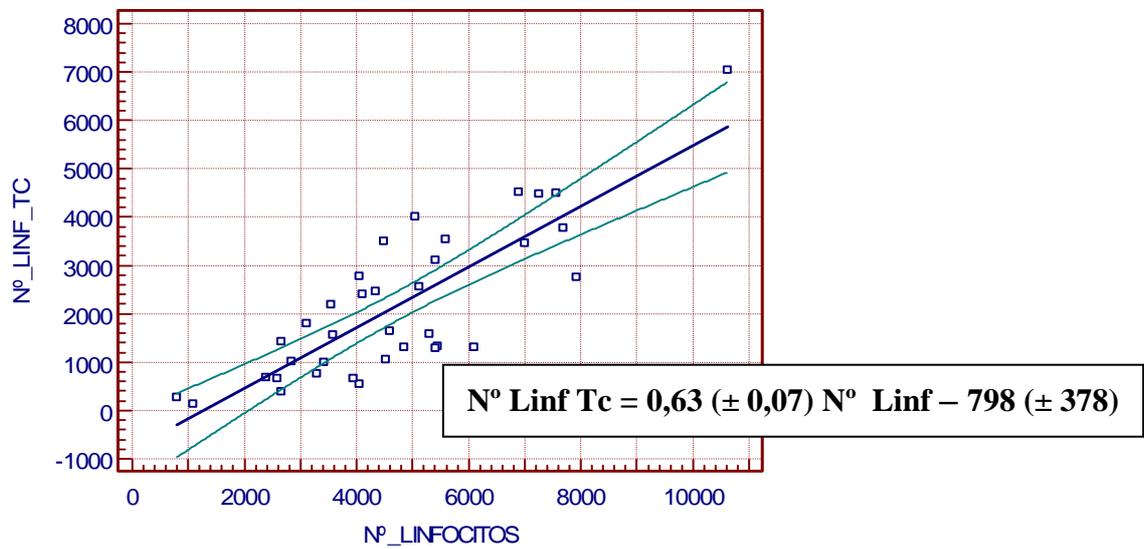


Tabla. 5.3.6.3.2. Regresión lineal entre el número de linfocitos y el número de linfocitos Tc en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

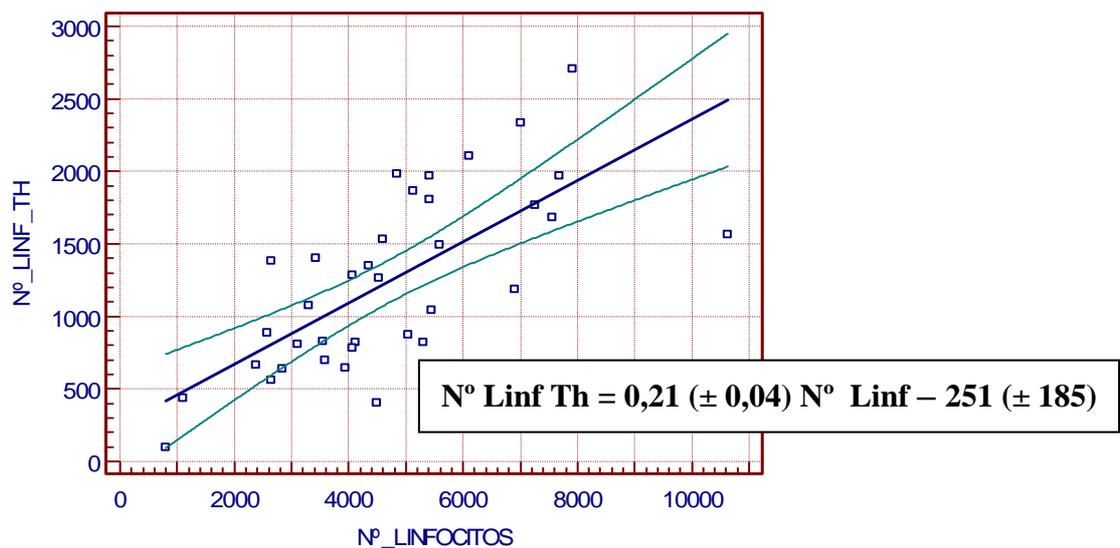


Tabla. 5.3.6.3.3. Regresión lineal entre el número de linfocitos y el número de linfocitos Th en el grupo de perros con Ehrlichiosis.

El valor del número de linfocitos puede ser fácilmente determinado a partir de un recuento diferencial leucocitario conociendo el número total de glóbulos blancos de una muestra de sangre. A partir de este valor y aplicando las formulas señaladas en los tablas anteriores podemos calcular el número de linfocitos T, Tc y Th de un perro con ehrlichiosis en fase subclínica.

Como hemos señalado, los estudios sobre el inmunofenotipo en el curso de la ehrlichiosis canina son limitados, la información disponible sobre las relaciones entre los parámetros biopatológicos y las poblaciones linfocitarias es prácticamente inexistente y mucho más la que profundiza en un posible análisis de regresión. Por ello, consideramos que estos resultados deben considerarse como un punto de partida que deberían ser confirmados y ampliados con nuevos estudios, que por otra permitirían reducir los márgenes de confianza de los coeficientes de las ecuaciones obtenidas precisando así la estimación de cada una de las poblaciones linfocitarias calculadas.

5.4. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS EN PERROS CON EHRLICHIOSIS

Los controles realizados tras el tratamiento tenían como objetivo principal poder valorar la posible normalización de los parámetros alterados al comienzo de la investigación en los animales con ehrlichiosis. La normalización de estos parámetros serviría para afirmar la evolución favorable tras el tratamiento.

Partíamos de una población clínicamente sana que a lo largo del periodo de estudio post-tratamiento mantuvo esta condición. Por tanto, podemos afirmar que durante los 6 meses de duración del trabajo, ninguno de los animales incluidos en el estudio progresó hacia la fase crónica de la enfermedad.

Los valores hematológicos, que de manera global se encontraron dentro de la normalidad desde el inicio del estudio, se mantuvieron dentro del rango tras el tratamiento. Tan sólo se observaron ligeras fluctuaciones de los índices eritrocitarios que podrían ser debidos al azar.

Las alteraciones observadas de partida en nuestra población canina afectada de ehrlichiosis fueron: trombocitopenia (36%), hiperproteïnemia (40%), hipoalbuminemia (40%), hiperglobulinemia (50%) y alteración del cociente albúmina/globulinas (75%).

En cuanto a la trombocitopenia, no se observaron variaciones significativas en la población a lo largo de los 6 meses post-tratamiento. Se ha descrito la recuperación de los valores plaquetarios normales durante el 2º trimestre tras el tratamiento, si bien en el caso del dipropionato de imidocarb esta mejoría se produce incluso más tarde (Sainz, 1996). La ausencia de una recuperación estadística de la trombocitopenia puede deberse a las peculiaridades del tratamiento con dipropionato de imidocarb, sin que se pueda descartar la imprecisión de los métodos automáticos empleados para el recuento de plaquetas.

En nuestro estudio, el tratamiento con dipropionato de imidocarb no produjo variaciones estadísticamente significativas en las alteraciones del perfil del proteinograma en los seis meses que se prolongó el trabajo. La mayoría de los estudios indican que la normalización del cociente albúmina/globulinas y de las diferentes fracciones proteicas tiene lugar de un modo progresivo entre los 3 y 9 meses post-tratamiento (Buhles *et al*, 1974; Greene y Harvey, 1984; Perille y Matus, 1991; Greene, 1995; Sainz, 1996). Tal y como ocurre con el recuento de plaquetas, se ha observado que la normalización de los valores proteicos se realiza más tempranamente en aquellos individuos en los que se emplea doxiciclina o un tratamiento mixto de doxiciclina y dipropionato de imidocarb, que en los tratados exclusivamente con dipropionato de imidocarb (Sainz, 1996). En nuestro caso, no detectamos la normalización de estos valores a lo largo de los seis meses de estudio, lo que dificulta la valoración de este tratamiento e indica que podría ser necesaria una investigación durante periodos más prolongados de tiempo para valorar más

correctamente si este tratamiento es eficaz pero a más largo plazo o si, por el contrario, este fármaco no es tan efectivo.

En este sentido, los resultados obtenidos con este fármaco son variables ya que, mientras algunos autores constatan su efecto terapéutico (Ogunkoya *et al*, 1981) e incluso lo consideran más eficaz que la tetraciclina (Van Heerden y Van Hereden, 1981), algunos estudios *in vitro* dudan de la eficacia de este fármaco (Brouqui y Raoult, 1992). En cualquier caso, la efectividad del tratamiento con imidocarb ha sido clínicamente constatada por diversos autores, si bien se han encontrado resistencias a este tratamiento. Los casos resistentes al tratamiento con imidocarb se han observado hasta en un 16,1% al emplear una única dosis (Adeyanju y Aliu, 1982) y en un 6% al usar un protocolo con dos dosis (Sainz, 1996), similar al empleado por nosotros. En ambos estudios, estas resistencias aparecían en animales muy deteriorados y en el curso de ehrlichiosis crónica con insuficiencia renal y/o aplasia medular, en los que el pronóstico suele ser desfavorable (Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991). La eficacia de este tratamiento, demostrada por otros autores, y el tratamiento de la enfermedad en la fase subclínica nos induce a pensar que la no normalización de los parámetros estudiados se debe atribuir a la lenta recuperación de estos valores en el tratamiento con imidocarb.

Tras una respuesta efectiva a la terapia esperaríamos encontrar una tendencia a la normalización del perfil inmunofenotípico, sin embargo, no se han detectado variaciones en la mayoría de los valores de las poblaciones y subpoblaciones leucocitarias en animales con ehrlichiosis a lo largo de toda la investigación. Tan sólo se aprecia una disminución en los linfocitos B en el último periodo del estudio y un incremento en la población de linfocitos NK en el periodo comprendido entre 2-4 semanas en cuanto a valor porcentual y entre 2 semanas y 3 meses en valor absoluto.

No hemos encontrado variables que nos puedan indicar la existencia de una recuperación de la enfermedad a nivel del estudio inmunofenotípico de estos animales, siendo difíciles de interpretar las variaciones observadas en linfocitos B y NK, en presencia de la invariabilidad del resto de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. No obstante, el

aumento de linfocitos NK post-tratamiento podría ser un indicador favorable, puesto que estos linfocitos son productores de IFN- γ , citoquina que interviene en la destrucción macrofágica de patógenos intracelulares (Scharton y Scott, 1993).

El objetivo de encontrar algún parámetro que pudiese ser empleado como marcador de la recuperación de la enfermedad tras el tratamiento no ha podido ser logrado por completo. Aunque se han encontrado importantes variaciones en el perfil inmunofenotípico de las poblaciones linfocitarias de los perros afectados por ehrlichiosis subclínica, no hemos podido hallar variaciones significativas en el mismo en el periodo de seis meses post-tratamiento.

Este hecho puede deberse a tres supuestos:

- que en los casos de ehrlichiosis subclínica se establezca un equilibrio del estado inmunitario que se mantiene en el tiempo y que formaría parte de los mecanismos que intervienen en la persistencia del estado latente de la infección y/o

- que el sistema inmunitario requiera de periodos más prolongados para su normalización y/o

- que es el tratamiento con dipropionato de imidocarb el que requiere de estos tiempos más prolongados tal y como han observado otros autores al evaluar otros parámetros biopatológicos. La mayor rapidez con que evolucionan estos parámetros en perros tratados con doxiciclina podría deberse no sólo a su mayor eficacia directa contra el agente causal sino a las propiedades inmunomoduladoras que últimamente se atribuyen a este fármaco (Kuzin *et al*, 2001; Stone *et al*, 2003).

Queda abierta la realización de un estudio durante un periodo de tiempo más prolongado y comparado con el tratamiento con doxiciclina, así como el estudio del perfil inmunofenotípico linfocitario en perros con ehrlichiosis aguda y crónica para ahondar en los mecanismos inmunitarios desencadenados ante la infección por *Ehrlichia* spp.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Tras el análisis y discusión de los resultados y atendiendo a los objetivos planteados en este trabajo de investigación podemos extraer las siguientes conclusiones:

1° Para el colectivo de perros, sanos, adultos, de ambos sexos, distintas razas y caracterizados por vivir en un entorno propio de una protectora, podemos establecer los siguientes valores de referencia del inmunofenotipo en sangre circulante (con un margen de confianza del 95%):

- Un porcentaje medio de Linfocitos B del $18,4 \pm 3,1\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 495 ± 188 de linfocitos B / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos NK del $7,3 \pm 1,3\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 178 ± 39 de linfocitos NK / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos T del $72,9 \pm 3,0\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 1815 ± 341 de linfocitos T / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos Th del $33,9 \pm 2,9\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 832 ± 139 de Linfocitos Th / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos Tc del $24,6 \pm 3,5\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 619 ± 168 de linfocitos Tc / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos T $\gamma\delta$ del $14,4 \pm 4,7\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 364 ± 138 de Linfocitos T $\gamma\delta$ / μ l.
- Y un valor medio del índice CD4⁺/CD8⁺ de $1,5 \pm 0,2$.

2° En el curso de la ehrlichiosis subclínica canina se producen importantes cambios en el inmunofenotipo en sangre, destacando el descenso moderado de los porcentajes de los linfocitos B, NK y Th, si bien esta última subpoblación linfocitaria presenta un aumento en su número absoluto. Además, en esta fase de la enfermedad se produce un aumento del número absoluto y relativo linfocitos Tc, lo que provoca no sólo una inversión del índice $CD4^+/CD8^+$, sino también un aumento del porcentaje y número de los linfocitos T. Estas modificaciones estadísticamente significativas con respecto al grupo control nos permiten estimar unos nuevos valores de referencia para la población canina afectada de ehrlichiosis en fase subclínica de:

- Un porcentaje medio de Linfocitos B del $12,1 \pm 2,8\%$ con respecto al total de linfocitos.
- Un porcentaje medio de Linfocitos NK del $3,84 \pm 0,7\%$ con respecto al total de linfocitos.
- Un porcentaje medio de Linfocitos T del $81,8 \pm 3,4\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 3924 ± 620 de Linfocitos T / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos Th del $27,1 \pm 3,2\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 1243 ± 202 de Linfocitos Th / μ l.
- Un porcentaje medio de Linfocitos Tc del $42,6 \pm 6,5\%$ con respecto al total de linfocitos y un valor medio de 2154 ± 516 de Linfocitos Tc / μ l.
- Y un valor medio del índice $CD4^+/CD8^+$ de $0,9 \pm 0,3$.

3° En la fase subclínica de la Ehrlichiosis canina, además de la linfocitosis observada en más del 40% de los casos, las alteraciones biopatológicas más frecuentes son la trombocitopenia (en torno al 40% de los casos) y la disproteinemia (en aproximadamente el 75% de los casos), estimándose que los valores medios obtenidos en el recuento de plaquetas ($259.780 \pm 41.300/\mu$ l) y en el cociente albúmina/globulinas ($0,60 \pm 0,10$) difieren significativamente con respecto a los observados en la población sana.

4° Las correlaciones altamente significativas observadas en la fase subclínica de la ehrlichiosis entre las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias y otros parámetros biopatológicos, ha permitido a través de un análisis de regresión lineal calcular las ecuaciones que nos estiman los valores los linfocitos T, Th y Tc de una sangre a partir del valor del número de linfocitos circulantes que ésta presente.

5° En perros con ehrlichiosis subclínica, las poblaciones linfocitarias más modificadas con respecto a la población sana no sufren variaciones significativas durante los 6 meses posteriores a la administración de 2 inyecciones de dipropionato de imidocarb (con un intervalo de 15 días entre ambas). En el seguimiento realizado, los únicos datos relevantes son un ligero incremento en el número de linfocitos NK en el primer mes y un descenso significativo del número de linfocitos B a los 6 meses, con respecto a los valores obtenidos antes del tratamiento.

RESUMEN

7.- RESUMEN

En el presente trabajo se han estudiado y comparado los valores hematológicos, el inmunofenotipo y las proteínas séricas de una población de cánidos sanos y otra población de perros seropositivos a *Ehrlichia canis*, en fase subclínica. Ambas poblaciones procedían de dos protectoras de la provincia de Valencia. La población seropositiva a ehrlichiosis se ha tratado con dipropionato de imidocarb (2 dosis de 5mg/kg vía subcutánea con un intervalo de 15 días entre ambas) y se ha estudiado la evolución en el tiempo de los valores hematológicos, el inmunofenotipo y las proteínas séricas a lo largo de 6 meses tras el tratamiento. Se ha realizado también un estudio de prevalencia de ehrlichiosis y leishmaniosis en estas protectoras.

Según los resultados obtenidos, en estas protectoras el 69,37% de los perros presenta seropositividad frente a *Ehrlichia canis* y un 28,12% presenta seropositividad frente a *Leishmania infantum*.

En la hematología de los animales en fase subclínica de ehrlichiosis de este estudio destaca como alteración laboratorial la elevación del recuento linfocitario. Otro hallazgo reseñable es la presencia de trombocitopenia, si bien se presenta en tan sólo un 36% de los animales estudiados.

En cuanto a las proteínas séricas destaca la existencia de disproteinemia en un 75% de los casos (con un valor medio del cociente Albúmina/Globulina de $0,60 \pm 0,05$) junto con una hiperproteinemia (en torno al 40%), a pesar de presentar algunos de ellos cifras de hipoalbuminemia (40% de los casos), asociada a hiperglobulinemia (50% de los casos).

A nivel del inmunofenotipo es de resaltar el incremento de los valores tanto relativos como absolutos de linfocitos T en la población con ehrlichiosis al compararlo con la población sana; en cuanto a la población de linfocitos B, sus valores absolutos se mantienen similares a los de los perros control. El importante incremento de la población de linfocitos T es motivado por un destacado aumento en el número de linfocitos Tc produciéndose una inversión del índice CD4/CD8. La linfocitosis observada en los perros con ehrlichiosis hace que, si bien los valores relativos de linfocitos Th se encuentran disminuidos, sus valores absolutos se encuentran por encima de los valores observados en los animales control.

En contra de lo que se esperaba observar, en el estudio de los parámetros analizados a lo largo del tiempo tras el tratamiento con dipropionato de imidocarb, si bien se producen algunas modificaciones en algunos controles, destaca la ausencia de variaciones significativas en la práctica totalidad de los parámetros estudiados a los 6 meses post-tratamiento, con excepción del valor medio del recuento de los linfocitos B, de los monocitos y en menor medida de los neutrófilos, que sufren un descenso con respecto a los valores iniciales.

SUMMARY

8.- SUMMARY

In this work a basal and a comparative study of the haematology, immunophenotype and seric protein values in a group of healthy dogs (Control group) and another group of dogs seropositive to *Ehrlichia canis* (dogs with subclinical ehrlichiosis) were carried out. Both canine populations came from two animal shelters of Valencia (Spain). Dogs were treated with imidocarb dipropionate (2 doses of 5 mg/kg SQ, with a period of 15 days apart). All the studied parameters were evaluated periodically for 6 months after therapy. For this purpose 4 blood analysis were performed in the dogs during that period of time.

A study of ehrlichiosis and leishmaniosis seroprevalence in the kennels was also performed; 69.37% of dogs were seropositive to *Ehrlichia canis* and 28.12% of the dogs were seropositive to *Leishmania infantum*.

Few haematologic abnormalities were found: thrombocytopenia was found in 36% of the dogs in the Ehrlichiosis group, being lymphocytosis other remarkable finding in this group.

On the other hand, alteration of seric protein values was common in the Ehrlichiosis group. Hyperproteinemia was detected in 70% of the dogs, even when many of them presented hypoalbuminemia (44% of dogs) and hyperglobulinemia (50% of animals).

The immunophenotype of dogs with subclinical ehrlichiosis was characterized by an increase in the absolute and relative counts of T lymphocytes in comparison with control dogs. However, absolute counts of B lymphocytes in dogs with subclinical ehrlichiosis were similar to those of the control group. The increase in T lymphocyte counts was due to the great rise of Tc lymphocyte counts. CD4/CD8 index was inverted due to this fact and the reduction in Th lymphocytes relative values. Nevertheless, Th lymphocyte absolute counts in the Ehrlichiosis group were increased in comparison with the values in the Control group due to the relevant lymphocytosis present in the group with subclinical ehrlichiosis.

No significant changes were found in the different variables studied over the 6 months following the treatment with imidocarb dipropionate. Only slight decreases were detected in the mean values of B lymphocytes, monocytes and neutrophils.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abeygunawardena, I.; Kakoma, I., and Smith, R.D. Pathophysiology of canine ehrlichiosis. Ehrlichiosis. Williams, J.C., and Kakoma, I. (Ed). Netherlands.: Kluwer Academic Publishers.; 1990; pp. 79-92.
- Abranches, P.; Silva-Pereira, M.C.; Conceicao-Silva, F.M.; Santos-Gomes, G.M., and Janz, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. J Parasitol. 1991; 77(4):557-561.
- Adams, D.H. and Lloyd, A.R. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. Lancet. 1997; 349:490-495.
- Adeyanju, B.J. and Aliu, Y.O. Chemotherapy of canine ehrlichiosis and babesiosis with imidocarb propionate. J Am Anim Hosp Assoc. 1982; 18:827-830.
- Aguirre, E.; Sainz, A.; Amusatogui, I.; Rodriguez, F., and Tesouro, M.A. Estudio serológico de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophila* y *Neorickettsia risticii* en perros residentes de colectividades de Madrid. Libro de Ponencias y Comunicaciones del 38 Congreso Nacional De AVEPA. Sevilla. 2003; 282.
- Aguirre, E.; Tesouro, M.A.; Ruiz, L.; Amusatogui, I., and Sainz, A. *Anaplasma platys* in Spain: first molecular characterization in a dog with clinical ehrlichiosis. Proceedings EMOP-IX. Valencia (España). 2004a.
- Aguirre, E.; Tesouro, M.A.; Amusatogui, I.; Rodríguez-Franco, F., and Sainz, A. Assessment of feline ehrlichiosis in Spain, using serology and PCR. Annals of New York Academy of Sciences (En Prensa). 2004b.
- Ahn, A.; Wallace, D., and Barrick, R.A. A comparative study of Frontline Top Spot and Revolution in the control of flea and tick infestations on dogs. WSAVA/FECAVA. 2000.
- Akkonyunlu, M. and Fikrig, E. Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. Infect Immun. 2000; 68(4):1827-1833.
- Allsopp, M.T.E.P. and Allsopp, B.A. Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(11):4204-4207.
- Anderson, B.E.; Dawson, J.E.; Jones, D.C., and Wilson, K.H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new specie associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1991; 29:2838-2842.
- Anderson, B.E.; Greene, C.E.; Jones, D.C., and Dawson, J.E. *Ehrlichia ewingii*, sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42:299-302.

- Anderson, B.E.; Sims, K.G.; Olson, J.G.; Childs, J.E.; Piesman, J.F.; Happ, C.M.; Maupin, G.O., and Johnson, B.J. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Aug;49(2):239-44. 1993; 49(2):239-244.
- Anthony, S.J.; Dummer, J.S., and Hunter, E. Human ehrlichiosis in a liver transplant recipient. *Transplantation.* 1995; 60:879-881.
- Anziani, D.S.; Ewing, S.A., and Barker, R.W. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe *Ehrlichieae* by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum*. *Am J Vet Res.* 1991; 51:929-931.
- Arraga-Alvarado, C.; Palmar, M.; Parra, O., and Salas, P. Fine structural characterisation of a Rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. *J. Med. Microbiol.* 1999; 48(11):991-997.
- Artursson, K.; Gunnarsson, A.; Wikstrom, U.B., and Engvall, E.O. A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. *Equine Vet J.* 1999; 31(6):473-477.
- Backer, L.C.; Grindem, C.B., and Hunter, J.L. Biomarkers in pet dogs - a sentinel for humans health effects from environmental pollution. *Proceedings for Health Effects of Hazardous Wastes Symposium.* United States Department of Health and Human Services. 1993; 216.
- Bakken, J.S.; Dumler, J.S.; Chen, S.M.; Eckman, M.R.; Van Etta, L.L., and Walker, D.H. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. A new species emerging? *J Am Med Assoc.* 1994; 272:212-218.
- Bakken, J.S.; Krueth, J.; Wilson-Nordskog, C.; Tildes, R.L.; Asanovich, K., and Dumler, J.S. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *J Am Med Assoc.* 1996; 275:199-205.
- Bakken, J.S and Dumler, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:554-560.
- Balashov, Y.S. Bloodsucking ticks (*Ixodoidea*): Vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America.* 1972; 8:161.
- Banerjee, R.; Anguita, J., and Fikrig, E. Granulocytic ehrlichiosis in mice deficient in phagocyte oxidase or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.* 2000; 68:4361.
- Barlough, J.E.; Reubel, G.H.; Madigan, J.E.; Vredevoe, L.K.; Miller, P.E., and Rikihisa, Y. Detection of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) from northern California. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:2888-2893.
- Bartsch, R.C. and Greene, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline an/or doxycycline. *J Vet Intern Med.* 1996; 10(4):271-274.
- Batmaz H.; Nevo E.; Waner T.; Senturk S.; Yilmaz Z., and Harrus S. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. *Vet Rec.* 2001; 148(21):665-666.
- Batungbacal, M.R. Effect of *Cytoecetes phagocytophila* on phagocytosis by neutrophils in sheep. *Vet Mad.* 1995; 32:70-76.
- Beaufils, J.P and Legroux, J.P. Présence simultanée d'*Ehrlichia sp* e d'*Hepatozoon canis* dans des granulocytes de chien: a propos de deux cas. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 1992; 27(1):81-86.

- Bellah, J.R.; Shull, R.M., and Selcer, E.V. *Ehrlichia canis* - related polyarthritis in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1986; 189(8):922-923.
- Berenberg, J.F.; Ward, P.A., and Sonenshine, D.E. Tick bite injury: mediation by a complement derived chemotactic factor. J Immunol. 1972; 109:451-456.
- Berton, G.; Yan, S.R.; Fumagalli, L., and Lowell, C.A. Neutrophil activation by adhesion: mechanisms and pathophysiological implications. Int J Clin Lab Res. 1996; 26(3):160-177.
- Bezuidenhout, J.D. Natural transmission of heartwater. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1987; 54:349-351.
- Binnington, K.C. and Kemp, D.H. Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. Adv Parasitol. 1980; 18:315.
- Bjorsdorff, A.; Svendenius, L., and Owens, J.H. Feline granulocytic ehrlichiosis-a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. J Small Anim Pract. 1999a; 40(1):20-24.
- Bjorsdorff, A.; Berglund, I.; Kristiansen, B.E. ; Soderstrom, C., and Eliasson, I. Variable presentation and course in human granulocytic ehrlichiosis: twelve case reports of the new tick -borne zoonosis. Lakartidningen. 1999b; 96:4200-4204.
- Borjesson D.L.; Simon S.I.; Hodzic E.; Ballantyne C.M., and Barthold S.W. Kinetics of CD11b/CD18 up-regulation during infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis in mice. Lab Invest. 2002; 82(3):303-311.
- Botros, B.A.M.; Elmolla, M.S.; Salib, A.W.; Calamaio, C.A.; Dasch, G.A., and Arthur, R.R. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort J Vet Res. 1995; 62:41-43.
- Bourdeau, P. The control of ticks in the dog. 16th Annual Meeting of the ESVD-ECVD. Helsinki. 1999; 113-116.
- Bourdeau, P. Acaricides: Topical or systemic? 18th ESVD-ECVD Annual Congress; Nice, France. 2002: 109-115.
- Bourdoiseau, G.; Bonnefont, C.; Magnol, J.P.; Saint-Andre, I., and Chabanne, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 1997; 56(3-4):345-351.
- Breitschwerdt, E.B.; Woody, B.J.; Zerbe, C.A.; De Buysscher, E.V., and Barta, O. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. J Vet Intern Med. 1987; 1(1):2-9.
- Breitschwerdt, E.B. The rickettsiosis. En: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Ettinger SV, Feldman EC (Eds). W.B. Saunders. Philadelphia. 1995; 376-383.
- Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C., and Hancock, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol. 1998a; 36(9):2645-2651.
- Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C., and Hancock, S.I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. Antimicrob Agents Chemother. 1998b; 42:362-368.
- Breitschwerdt, E.B. Ehrlichiosis: a new zoonosis? Compendium (Merial). 2002; 24(1):10-14.

- Breitschwerdt, E.B. Canine and feline ehrlichiosis: new developments. 19th Annual Congress of the ESVD-ECVD. Tenerife, Spain. 2003; 66-71.
- Brenner, D.J.; O'Connor, S.P.; Winkler, H.H., and Steigerwalt, A.G. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43(4):777-786.
- Bressler, C.; Himes, L.C., and Moreau, R.E. Portal vein and aortic thromboses in a Siberian husky with ehrlichiosis and hypothyroidism. J Small Anim Pract. 2003; 44(9):408-410.
- Brouqui, P. and Raoult, D. In vitro susceptibility of *Ehrlichia sennetsu* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(8):1593-1596.
- Brouqui, P. and Raoult, D. In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans, *Ehrlichia chaffeensis*. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(12):2799-2803.
- Brouqui, P. and Dumler, J.S. Serologic evidence of human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Israel. Emerg Infect Dis. 2000; 6(3):314-315.
- Brown, G.K.; Martin, A.R.; Roberts, T.K., and Aitken, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust Vet J. 2001; 79(8):554-558.
- Brown, W.C.; Brayton, K.A.; Styer, C.M., and Palmer, G.H. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. J Immunol. 2003; 170:3790-3798.
- Broxmeyer, H.E.; Sherry, B.; Lu, L.; Cooper, S.; Oh, K.O.; Tekamp-Olson, P.; Kwon, B.S., and Cerami, A. Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. Blood. 1990; 76(6):1110-1116.
- Bucci, J.B.; Gebhard, D.H.; Childers, T.A.; English, R.V., and Tompkins, W.A.F. The CD8+ cell phenotype mediating antiviral activity in feline immunodeficiency virus-infected cats is characterized by reduced surface expression of the CD8 β chain. J Infect Dis. 1998; 178:968-977.
- Bucy, P.; Chen, C.L.; Cichak, J.; Losh, V., and Cooper, M. Avian T cells expressing $\gamma\delta$ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. J Immunol. 1988; 141:2200-2205.
- Buhles, W.C.Jr.; Huxsoll, D.L, and Ristic, M. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. J Infect Dis. 1974; 130:357-367.
- Buhles, Jr.W.C.; Huxsoll, D.L., and Hildebrandt, P.K. Tropical canine pancytopenia: Role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease. J Comp Path. 1975; 85:85: 511-21, 1975.511-521.
- Buller, R.S.; Arens, M., and Hmiel, S.P. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med. 1999; 341:148-155.
- Bunnell, J.E.; Trigiani, E.R.; Srinivas, S.R., and Dumler, J.S. Development and distribution of pathologic lesions are related to immune status and tissue deposition of human granulocytic ehrlichiosis agent-infect cells in a murine model system. J Infect Dis. 1999; 180(2):546-550.
- Buoro, I.B.J.; Kanui, T.I.; Atwell, R.B.; Njenga, K.M., and Gathumbi, P.K. Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. J Small Anim Pract. 1990; 31:624-627.

- Burg, J.G.; Neely, D.M.; Williams, N.M., and Knapp, F.W. Retention and attempted mechanical transmission of *Ehrlichia risticii* by *Stomoxys calcitrans*. *Med Vet Entomol.* 1994; 8(1):43-36.
- Burghen G.A.; Beisel, W.R.; Walker, J.S.; Nims, R.M.; Huxsoll, D.L., and Hildebrant, P. K. Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *Am J Vet Res.* 1971; 32:749-756.
- Byrne, K.M; Hong Wook Kim; Chew, B.P; Reinhart, G.A., and Hayek, M.G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000; 73:167-182.
- Byrom, B.; Mahan, S.M., and Barbet, A.F. The development of antibody to *Cowdria ruminantium* in mice and its role in heartwater disease. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1993; 46(1-2):197-201.
- Caldwell, C.W.; Everett, E.D., and McDonald, G. Lymphocytosis of $\gamma\delta$ T cells in human ehrlichiosis. *Am J Clin Pathol.* 1995; 103:761-766.
- Calvelli, T.T.; Denny, T.N.; Paxton, H.; Gelman, R., and Kagan, J. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: A report from the National Institute of Allergy and Infectious diseases. Division of Aids. *Cytometry.* 1993; 14:702-715.
- Camus, E. and Barre, N. Epidemiology of heartwater in Guadeloupe and in the Caribbean. *Onderstepoort J Vet Res.* 1987; 54(3):419-426.
- Carpenter, C.F.; Gandhi, T.K.; Kong, L.K.; Corey, G.R.; Chen, S.M.; Walker, D.H.; Dumler, J.S.; Breitschwerdt, E.; Hegarty, B., and Sexton, D.J. The incidence of ehrlichial and rickettsial infection in patients with unexplained fever and recent history of tick bite in central North Carolina. *J Infect Dis.* 1999; 180(3):900-903.
- Carvalho, E.M.; Johnson, W.D.; Barreto, E.; Marsden, P.D.; Costa, J.L.; Reed, S., and Rocha, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 1985; 135(6):4144-4148.
- Caswell, J.L.; Yage, J.A; Parker, W.M., and Moore, P.F. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. *Vet Pathol.* 1997; 34:279-287.
- Cenini, P.; Berhe, N.; Hailu, A.; McGinnes, K., and Frommel, D. Mononuclear cell subpopulation and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J Infect Dis.* 1993; 168:986-993.
- Centers for Disease Control and Prevention. Lyme Disease: United States, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1996;45:481-484.
- Chabanne, L.; Marcha, T.; Denerolle, P.; Magnol, J.P.; Fournel, P.; Monier, J.C., and Rigal, D. Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 49:189-198.
- Chabanne L.; Bonnefont C.; Bernaud J., and Rigal D. Clinical Applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). *Methods Cell Sci.* 2000; 22(2-3):199-207.
- Chae, J.S.; Pusterla, N.; Johnson, E.; Derock, E.; Lawler, S.P., and Madigan, J.E. Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying *Ehrlichia risticii*, the cause of Potomac horse fever. *J Med Entomol.* 2000; 37(4):619-625.

- Chae, J. S.; Kim, M. S., and Madigan, J. Detection of *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* in tissues of mice experimentally infected with cercariae of trematodes by in situ hybridization. *Vet Microbiol.* 2002; 88(3):233-43.
- Chang, A.C.; Chang, W.L.; Lin, C.T.; Pan, M.J., and Lee, S.C. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. *J Vet Med Sci.* 1996 May;58(5):473-6. 1996; 58(2):473-476.
- Charley, B. and Blecha, F. Les cytokines: leur rôle dans la régulation du système immunitaire, leur utilisation potentielle chez l'animal. *Point Vet.* 1991; 23(139):71-77.
- Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Bakken, J.S., and Walker, D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(3):589-595.
- Cillari, E.; Liew, F.Y.; Lo Campo, P.; Milano, S.; Mansueto, S., and Salerno, A. Suppression of IL-2 production by cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from patients with active visceral leishmaniasis in Sicily. *J Immunol.* 1988; 140(8):2721-2726.
- Codner, E.C.; Roberts, R.E., and Ainsworth, A.G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1985; 186(2):166-169.
- Codner, E.C. and Farris-Smith, L.L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J Am Vet Med Ass.* 1986; 189:47-50.
- Codner, E.C. and Maslin, W. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53(3):264-269.
- Cohn L.A. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract.* 2003; 33:863-884.
- Coligan, J.E.; Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M., and Strober, W. Antibody detection and preparation. En: *Current protocols in immunology.* 1992. John Wiley and sons. New York, unit 2,4.
- Cordero del Campillo, M. Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. Madrid. 1980; 489.
- Cowell, R.L., Tyler, R.D., and Clinkenberad, K.D. Ehrlichiosis and poliartthritis in three dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1988; 192(8):1093-1095.
- Cruthers, L.; Slone, R., and Arther, R.G. K9 Advantix (imidacloprid plus permethrin) for controlling ticks and mosquitoes on dogs. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2003; 25(suppl):15-18.
- Culmsee, K.; Simon, D.; Mischke, R., and Nolte, I. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001; 48(4):199-206.
- Culmsee, K. and Nolte, I. Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods Cell Sci.* 2002; 24(1-3):49-54.
- Cupp, E.W. Biology of ticks: Tick-transmitted diseases. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract.* 1991; 21(1):1-26.
- Davoust, B.; Parzy, D.; Ott, D., and Hasselot, N. Ehrlichiose canine chronique: intérêt de la numération plaquettaire. *Rev Méd Vét.* 1991a; 142:287-292.
- Davoust, B.; Parzy, D.; Vidor, E.; Hasselot, N., and Martet, G. Ehrlichiose canine expérimentale: étude clinique et thérapeutique. *Rev. Méd. Vét.* 1991b; 167:33-40.

- Davoust, B. Canine ehrlichiosis. *Point Vét.* 1993; 25(151):43-51.
- Davoust, B; Marie, J., and Mercier, S. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Vet Parasitol.* 2002; 112:91-100.
- Dawson, J.E.; Anderson, B.E.; Fishbein, D.B.; Sánchez, J.L.; Goldsmith, C.S.; Wilson, K.H., and Duntley, C.W. Isolation and characterization of an *Ehrlichia sp.* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(2741-2745).
- Dawson, J.E. and Ewing, S.A. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *Am J Vet Res.* 1992; 53(8):1322-1327.
- Dawson, J.E.; Stallknecht, D.E.; Howerth, E.W.; Warner, C.; Biggie, K.; Davidson, W.R. ; Lockhart, J.M.; Nettles, V.F.; Olson, J.G., and Childs, J.E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(1):2725-2728.
- De Castro, M. B.; Machado, R.Z.; Tomaz de Aquino, L.P.C.; Alessi, A.C., and Costa, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol.* 2004; 119:73-86.
- De Rosa, S.C.; Andrus, J.P.; Perfetto, S.P.; Mantovani, J.J.; Herzenberg, L.A.; Herzenberg, L.A., and Roederer, M. Ontogeny of $\gamma\delta$ T cells in humans. *J Immunol.* 2004; 172:1637-1645.
- Deem, S.L. A review of heartwater and the threat of introduction of *Cowdria ruminantium* and *Amblyomma spp.* ticks to the American mainland. *J Zoo Wild Med.* 1998; 29(2):109-113.
- Deitsch, K.W.; Moxon, E.R., and Wellems, T.E. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997; 61:281.
- Des Vignes, F.; Piesman, J., and Heffernan, R. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis.* 2001; 183:773-778.
- Deusch, K.; Luling, F.; Reich, K.; Classen, M.; Wagner, H., and Pfeffer, K.A. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule, and preferentially uses the $v\delta 1$ gene segment. *Eur J Immunol.* 1991; 21:1053-1059.
- Dib, K. BETA 2 integrin signalling in leukocytes. *Front Biosci.* 2000; 5:438-451.
- Dirscherl, P.; Beisker, W.; Kremmer, E.; Mihalkov, A.; Voss, C., and Ziessenis, A. Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 48:1-10.
- Donatien, A. and Lestoquard, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bull Soc Pathol Exot.* 1935; 28:418-419.
- Dumler, J.S.; Asanovich, K.M., and Bakken, J.S. Serologic cross reaction among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic ehrlichia. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(5):1098-1103.
- Dumler J.S; Trigiani E.R.; Bakken J.S.; Aguero-Rosenfeld M.E., and Wormser G.P. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(1):6-8.

- Dumler J.S.; Barbet A.F.; Bekker C.P.J.; Dash G.A.; Palmer G.H.; Ray S.C.; Rikihisa Y., and Rurangirwa F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51:2145-2165.
- Duque, C.; Parent, J., and Bienzle, D. The immunophenotype of blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in dogs. *J Vet Intern Med*. 2002; 16:714-719.
- Dutra, F.; Schuch, L.F.; Delucchi, E.; Curcio, B.R.; Coimbra, H.; Raffi, M.B.; Dellagostin, O., and Riet-Correa, F. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. *J Vet Diagn Invest*. 2001; 13(5):433-437.
- Elfassy, O.J.; Goodman, F.W.; Levy, S.A., and Carter, L.L. Efficacy of an amitraz-impregnated collar in preventing transmission of *Borrelia burgdorferi* by adult *Ixodes scapularis* to dogs. *JAVMA*. 2001; 219(2):185-189.
- Elias, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *Ehrlichia canis*. *J Small Anim Pract*. 1991; 33(11):540-543.
- Eng, T.R.; Harkess, J.R., and Fishbein, D.B. Epidemiologic, clinical and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. 1990; 264:2251-2258.
- Engvall, E.O.; Pettersson, B.; Persson, M.; Artursson, K., and Johansson, K.E. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. *J Clin Microbiol*. 1996. 1996; 34(9):2170-2174.
- Estrada-Peña, A. Las garrapatas en España: introducción. *Consejería De Sanidad y Bienestar Social. Junta de Castilla y León (Ed)*. Valladolid. 1994.
- Estrada-Peña, A. and Ascher, F. Comparison of an amitraz-impregnated collar with topical administration of fipronil for prevention of experimental and natural infestations by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *JAVMA*. 1999; 214:1799-1803.
- Estrada-Peña, A. Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* in northern Spain. *J Med Entomol*. 2001; 38(3): 361-70.
- Estrada-Peña, A. Importancia de las garrapatas en España. *Argos*. 2003a; 48:20-22.
- Estrada-Peña, A. Las garrapatas del perro y las enfermedades transmitidas en España: una panorámica con aspectos zoonóticos. *Ed Virbac*; 2003b.
- Everett, E.D.; Evans, K.A.; Henry, B., and McDonald, G. Human ehrlichiosis in adults after tick exposure. *Ann Intern Med*. 1994; 120:730-735.
- Ewing, S.A. and Buckner, R.G. Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in the dog. *Am J Vet Res*. 1965; 26(113):815-828.
- Ewing, S.A. Canine ehrlichiosis. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1969; 13:331-353.
- Ewing, S.A.; Roberson, W.R.; Buckner, R.G., and Hayat, C.S. A new strain of *Ehrlichia canis*. *J Am Vet Med Assoc*. 1971; 159(12):1771-1774.

- Fahey, J.L.; Prince, H.; Weaver, M.; Groopman, J.; Visscher, B.; Schwartz, K., and Detels, R. Quantitative changes in T helper or T-suppressor/cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immunodeficiency syndrome from other immune subsets disorders. *Am J Med.* 1984; 76:95-100.
- Faldyna, M.; Leva, L.; Knotigova, P., and Toman, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs: a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 82(1-2):23-37.
- Feng, H.M. and Walker, D.H. Mechanisms of Immunity to *Ehrlichia muris*: a Model of Monocytotropic Ehrlichiosis. *Infect Immun.* 2004; 72(2):966-971.
- Fichtenbaum, C.J.; Peterson, L.R., and Weil, G.J. Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness with features of the toxic shock syndrome. *Am J Med.* 1993; 95:351-357.
- Fishbein, D.B.; Dawson, J.E., and Robinson, L.E. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann Intern Med.* 1994; 120:736-743.
- Foley, J.E.; Crawford-Miksza, L., and Dumler, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis in northern California: two cases description with genetic analysis of the *Ehrlichiae*. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:388-392.
- Folz, S.D.; Ash, K.A., and Conder, G.A. Amitraz: A tick and flea repellent and tick detachment drug. *J Vet Pharmacol Ther.* 1986; 9:150-156.
- Font, A.; Cairó, J., and Callés, A. Ehrlichiosis canina. *Clínica Veterinaria De Pequeños Animales.* 1988; (8):141-148.
- Frank, J.R. and Breitschwerdt, E.B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Int Med.* 1999; 13(3):194-201.
- Freitas, A.A. and Rocha, B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:83-111.
- French, T.W. and Harvey, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am J Vet Res.* 1983; 44:2407-2411.
- Fukuda, T. and Yamamoto, S. Neorickettsia-like organism isolated from metacercaria on a fluke, *Stellantchasmus falcatus*. *Jpn J Med Sci Biol.* 1981; 34(2):103-107.
- Fuller, L.; Carreno, M.; Esquenazi, V.; Zucker, K.; Zheng, S.; Roth, D.; Burke, G.; Nery, J. ; Asthana, D., and Olson, L. Characterization of anti-canine cytokine monoclonal antibodies specific for IFN- γ : effect of anti-IFN- γ on renal transplant rejection. *Tissue Antigens.* 1994; 43:163-169.
- Ganta, R.R.; Chuanmin, Ch.; Wilkerson, M.J., and Chapes, S.K. Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4⁺ T-cell knockout mice. *Infect Immun.* 2004; 72 (1):159-167.
- Garcia-Perez, A.L.; Barandika, J.; Oporto, B.; Povedano, I., and Juste, R.A. Anaplasma phagocytophila as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 990:429-432.
- Gardner, S.L.; Holman, R.C.; Krebs, J.W.; Berkelman, R, and Childs, J.E. National surveillance for the human ehrlichiosis en the United States, 1997-2001, and proposed methods for evaluation of data quality. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 990:80-89.
- Garris, G.I. Control of ticks. *Vet Clin North Am.* 1991; 21:173-183.
- Garrity , G.M.; Winters, M., and Searles, D.B. Taxonomic outline of the procaryotic genera. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Second Edition, April. 2001; 6 .

- Gebhard, D.H. and Carter, P.B. Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 33:187-199.
- Gelatt, K.N. Canine anterior uvea. En: *Veterinary Ophthalmology*. Gelatt K.N. (ed). Lea and Febiger. Philadelphia. 1991; 374-375.
- Gewirtz, A.; Cornbleet, P., and Vugia, D.J. Human granulocytic ehrlichiosis: report of a case in northern California. *Clin Infect Dis.* 1996; 23:653-654.
- Ghorbel, A.; Cadore, J. L.; Clerc, B.; Bouattour, A.; Vidor, E., and Sayn, M.J. Efficiency of oxytetracyclin in dog ehrlichiosis treatment. *Revue Med. Vet.* 1993a; 144(2):109-114.
- Ghorbel, A.; Clerc, B.; Cadoré, J.L.; Djaeiim, A., and Sayn, M.J. Ehrlichiosis asymptomatique: etude de l'electrophorese des protéines seriques. *Recueil De Médecine Vétérinaire.* 1993b; 169:561-566.
- Gil, R.; Mercier, P.; Sánchez, I.; Bled, C; Laugier, S.; Tixier, S., and Ascher, F. Control de la infestación natural por *Rhipicephalus sanguineus* en un criadero de perros. *Proceedings del 33 Congreso Anual de AVEPA.* 1998;38.
- Gokce, H.I. and Woldehiwet, Z. Lymphocyte responses to mitogens and rickettsial antigens in sheep experimentally infected with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. *Vet Parasitol.* 1999; 83(1):55-64.
- Goldman, E.E.; Breitschwerdt, E.B., and Grindem, C.B. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med.* 1998; 12(2):61-70.
- González, J. M.; Puig, V.; Collado, E., and Simeón, S. Seroprevalencia de ehrlichiosis canina en la provincia de Valencia. *Consulta de Difusión Veterinaria.* 2000; 76:67-71.
- Goodman, T. and Lefrancoi, S.L. Expression of the $\gamma\delta$ T cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocyte. *Nature.* 1988; 33:855-858.
- Goodman, R.A.; Hawkins, E.C.; Olby, N.J; Grindem, C.B.; Hegarty, B., and Breitschwerdt, E.B. Molecular identification of *Ehrlichia ewingii* infection in dogs: 15 cases (1997-2001). *J Am Vet Med Assoc .* 2003; 222(8):1102-1107.
- Gothe, R.; Kunze, K., and Hoogstraal, H. The mechanisms of pathogenicity in the tick paralyses. *J Med Entomol.* 1979; 16:357.
- Gould, D.J.; Murphy, K.; Rudolf, H., and Crispin, S.M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months a importation into the UK. *J Small Anim Pract.* 2000; 68(7):263-265.
- Greeley, E.H.; Kealy, R.D.; Ballam, J.M.; Lawler, D.F., and Segre, M. The influence of age on the canine immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 55:1-10.
- Greene, C.E. and Harvey, J.W. Canine ehrlichiosis. En: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C.E. Greene (Ed). W.B. Saunders. Philadelphia . 1984; 704-709.
- Greene, C.E.; Burgdorfer, W.; Cavagnolo, R.; Philip, R.N., and Peacock, M.G. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1985; 186(5):465-472.
- Greene, R.T. Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors. En: Bonagura, J.D., ed. *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*. WB Saunders; 1995; pp. 376-383.

- Greig, B.; Asanovich, K.M., and Armstrong, P.J. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(1):44-48.
- Gribble, D.H. Equine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1969; 155(2):462-469.
- Grindem, C.B. Blood cell markers. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract.* 1996; 26(5):1043-1064.
- Grindem, C.B.; Breitschwerdt, E.B.; Perkins, P.C.; Cullins, L.D.; Thomas, T.J., and Hegarty, B.C. Platelet associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999; 35(1):56-61.
- Groves, M.G.; Dennis, G.L.; Amyx, H.L., and Huxsoll, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res.* 1975; 36(7): 937-940.
- Guarga, J.L; Moreno, J.; Lucientes, J.; Gracia, M.J.; Peribáñez, M.A; Alvar, J., and Castillo, J.A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Science.* 2000; 69:249-253.
- Guarga, J.L; Moreno, J.; Lucientes, J.; Gracia, M.J.; Peribáñez, M.A, and Castillo, J.A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 88:13-20.
- Guglielmino, R.; Miniscalco, B.; Tarducci, A.; Borgarelli, M.; Riondato, F.; Zini, E.; Borrelli, A., and Bussadori, C. Blood lymphocyte subsets in canine idiopathic pericardial effusion. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 98:161-173.
- Harkess, J.R.; Ewing, S.A.; Crutcher, J.M.; Kudlac, J.; McKee, G., and Istre, G.R. Human ehrlichiosis in Oklahoma. *J Infect Dis.* 1989; 159:576-579.
- Harkess, J.R. Ehrlichiosis. *Infect Dis Clin North Am.* 1991; 5:37-51.
- Harrus, S.; Waner, T.; Avidar, Y.; Bogin, E.; Peh, H., and Bark, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 1996a; 66(3-4):241-249.
- Harrus, S.; Waner, T.; Weiss, D. J.; Keysary, A., and Bark, H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996b; 51(1-2):13-20.
- Harrus, S.; Aroch, I.; Lavy, E., and Bark, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec.* 1997; 141(10):247-250.
- Harrus, S.; Waner, T., and Aizenberg, I. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol.* 1998a; 36(1):73-76.
- Harrus, S.; Waner, T.; Keysary, A.; Voet, I. H., and Bark, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998b; 62:15-27.
- Harrus, S.; Ofri, R.; Aizenberg, I., and Waner, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol.* 1998c; 78(2):155-160.
- Harrus, S.; Waner, T.; Bark, H.; Jongejan, F., and Cornelissen, A.W.C.A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(9):2745-2749.

- Harrus, S. ; Day, M.J.; Waner, T., and Bark, H. Presence of immunocomplexes, and absence of antinuclear antibodies in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. 2001; 83Kluwer Academic Publishers.:343-349.
- Harrus, S.; Alleman, A.R., and Bark, H.. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. Vet Microbiol. 2002; 86(4):361-368.
- Harty, J.T.; Tvinnereim, A. R., and White, D.W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu Rev Immunol. 2000; 18:275-308.
- Harvey, J.W. Canine thrombocytic ehrlichiosis. En: Greene, C.G., ed. Infectious diseases of the dog and cat . 2 ed. WB Saunders; 1998; pp. 147-149.
- Hayday, A.C. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. Annu Rev Immunol. 2000; 18:975-1026.
- Heeb, H.L.; Wilkerson, M.J.; Chun,R., and Ganta, R.R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. J Am Anim Hosp Assoc. 2003; 39(4):379-384.
- Hein, W.R. and Mackay, C.R. Prominence of $\gamma\delta$ T-cells in the ruminant immune system. Immunol Today. 1991; 12:30-34.
- Hernández, A. and Lorente, C. Síndrome cervico-torácico asociado a infección por *Ehrlichia canis*. Proceedings del 38 Congreso de AVEPA. Sevilla. 2003; 321.
- Herrero, C.; Pelaz, C.; Alvar, J.; Molina, R.; Vazquez, J.; Anda, P.; Casal, J.; and Martin-Bourgon, C. Evidence of the presence of spotted fever group *Rickettsiae* in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. Eur J Epidemiol. 1992;8(4):575-579.
- Hibler, S.C.; Hoskins, J.D., and Greene, C. E. Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. Compend Contin Educ Pract Vet . 1986; 106-114.
- Hildebrant, P.K; Huxsoll, D.L; Walker, J.S; Nims, R.M; Taylor, R., and Andrews, M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). Am J Vet Res. 1973; 34:1309-1320.
- Hill, J.O.; Awwad, M., and North, R.J. Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. J Exp Med. 1989; 169:1819-1827.
- Hodzic, E.; Fish, D.; Maretzki, C.M.; De Silva, A.M.; Feng, S., and Barthold, S.W. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. J Clin Microbiol. 1998; 36(12):3574-3578.
- Holland, C.J.; Weiss, E.; Burgdorfer, W.; Cole, A.I., and Kakoma, I. *Ehrlichia risticii* sp. nov.: etiological agent of equine monocytic ehrlichiosis (synonym Potomac horse fever). Int J Syst Bacteriol. 1985a; 35:524-526.
- Holland, C.J.; Ristic, M.; Cole, A.I.; Johnson, P.; Baker, G., and Goetz, T. Isolation, experimental transmission, and characterization of causative agent of Potomac horse fever. Science. 1985b; 227:522-524.
- Hoogstraal, H. Tickborne diseases of humans: a history of environmental and epidemiological changes. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Symposium Proceedings; 1977.

- Hoogstraal, H. *Argasid* and *Nuttalliellid* ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol.* 1985; 24:135.
- Hoskins, J. D.; Barta, O., and Rothschmitt, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1983; 183(9):1011-1012.
- Hoskins, J.D. and Cupp, E.W. Ticks of veterinary importance: Part 1. The *Ixodidae* family: Identification, behaviour, and associated diseases. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1988; 10:564.
- Hoskins, J.D. The brown dog tick. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract.* 1991; 21(1):99-101.
- Hunter, J.S.I. Efficacy of Frontline spray and Frontline Top Spot. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1997; 19(suppl):15-16.
- Huxsoll, D.L.; Hildebrant, P.K.; Nims, R.M., and Walker, J.S. Tropical canine pancytopenia. *J Am Vet Med Ass.* 1970; 157:1627-1632.
- Huxsoll, D.L.; Williams J.C., and Kakoma I. Ehrlichiosis. Netherlands. Ed: Kluwer Academic Publishers. 1990: 1-8.
- Iqbal, Z.; Chaichanasiriwithaya, W., and Rikihisa, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7):1658-1662.
- Iqbal, Z. and Rikihisa, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. *Vet Microbiol.* 1994; 42(4):281-287.
- Javed, M.Z.; Srivasta, M.; Zhang, S., and Kandathil, M. Concurrent babesiosis and ehrlichiosis in an elderly host. *Mayo Clin Proc.* 2001; 76(5):563-565.
- Johansson, K.E.; Pettersson, B.; Uhlén, M.; Gunnarsson, A.; Malmqvist, M., and Olsson, E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Res Vet Science.* 1995; 58:109-112.
- Jondal, M.; Schirmbeck, R., and Reimann, J. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity.* 1996; 5:295-302.
- Juste, R.A.; Scott, G.R.; Paxton, E.A.; Gelabert, J.L., and Jimenez, S. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. *Vet Record.* 1989; 124:636.
- Kakoma, I.; Carson, C.A.; Ristic, M.; Huxsoll, D.L.; Stephenson, E.H., and Nyindo, M.B.A. Autologous Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity Against Monocytes in Canine Ehrlichiosis. *Am J Vet Res.* 1977; 38(10):1557-1559.
- Kakoma, I.; Hansen, R.; Liu, L.; Fedrigo, S., and Bellamy, K. Serologically atypical canine ehrlichiosis associated with *Ehrlichia risticii* "infection". *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 199(9):1120.
- Kakoma, I.; Hansen, R.D.; Anderson, B.E.; Hanley, T.A.; Sims, K.G.; Liu, L.; Bellamy, C.; Long, M.T., and Baek, B.K. Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:170-175.
- Kakoma, I.; Sainz, A.; Tesouro, M.; Amusatogui, I.; Kim, C.H.; Biggerstaff, J.; McPeak, J., and Levy, M.G. Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis. Towards universal case definition. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 916:396-403.
- Katavolos, P; Armstrong, P.M., and Dawson, J.E. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis.* 1998; 177:1422-1425.

- Kawahara, M.; Suto, C.; Rikihisa, Y.; Yamamoto, S, and Tsuboi, Y. Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(1):89-96.
- Kawahara, M.; Ito, T.; Suto, C.; Shibata, S.; Rikihisa, Y.; Hata, K., and Hirai, K. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(4):1123-1129.
- Kaylor, P.S.; Crawford, T.B.; McElwain, T.F., and Palmer, G.H. Passive transfer of antibody to *Ehrlichia risticii* protects mice from ehrlichiosis. *Infect Immun.* 1991; 59(6):2058-2062.
- Keefe, T.; Holland, C.; Salyer, P.E., and Ristic, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *JAVMA.* 1982; 181:236-238.
- Keenan, C.M.; Hendricks, L.D.; Lightner, L., and Johnson, A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol.* 1984; 21(1):80-86.
- Kelly, P.J.; Carter, S.D.; Bobade, P.A.; Matthewman, L.A., and Bell, S.C. Absence of antinuclear antibodies in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Rec.* 1994a; 134(15):382.
- Kelly, P.J.; Matthewman, L.A.; Mahan, S.M.; Semu, S.; Peter, T.; Mason, P.R.; Brouqui, P., and Raoult, D. Serological evidence for antigenic relationships between *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. *Res Vet Sci.* 1994b; 56(2):170-174.
- Keren, D.F. History and evolution of surface marker assays. In Keren DF, Hanson, CA, Hartubise PE (Eds): *Flow Cytometry and Clinical Diagnosis.* Chicago, American Society of Clinical Pathologists . 1994; 1.
- Kidd, L. and Breitschwerdt, E.B. Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compendium.* 2003; 25(10):742-751.
- Kitron, U. and Kazmierczak, J.J. Spatial analysis of the distribution of Lyme disease in Wisconsin. *Am J Epidemiol.* 1997; 145:558-566.
- Klein, M.B.; Miller, J.S.; Nelson, C.M., and Goodman, J.L. Primary bone marrow progenitors of both granulocytic and monocytic lineages are susceptible to infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis.* 1997; 176(5):1405-1409.
- Klein M.B.; Hu S.; Chao C.G., and Goodman J.L. The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J Infect Dis.* 2000; 41(6):263-265.
- Knapp, W. Antibody-defined surface molecules of normal and malignant hematopoietic cells. In Laerum OD, Bjerknes R (Eds): *Flow Cytometry in Hematology.* London, Academic Press. 1992; 213.
- Kontos, V.I.; Papadopoulos, O., and French, T.W. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet Clin Pathol.* 1991; 20(4):101-105.
- Kontos, V.I. and Athanasiou, L.V. Use of enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis . *Canine Practice.* 1998; 23:10-14.
- Kopecky, J.; Kuthejlova, M., and Pechova, J. Salivary glands extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunol.* 1999; 21(7):351-6.

- Kordick, S.K.; Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C.; Southwick, K.L.; Hancock, S.I.; Bradley, J.M.; Rumbough, R.; McPherson, J.T., and McCormack, N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(8):2631-2368.
- Krause, P.J.; Corrow, C.L., and Bakken, J.S. Successful treatment of human granulocytic ehrlichiosis in children using rifampin. *Pediatrics.* 2003; 112(3):252-253.
- Kuehn, N.F. and Gaunt, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1985; 186(4):355-358.
- Kuttler, K.L. Pharmacotherapeutics of drugs used in treatment of anaplasmosis and babesiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1980; 176(10):1103-1108.
- Kuzin, I.I.; Snyder, J.E.; Ugine, G.D.; Wu, D.; Lee, S.; Bushnell, T.Jr; Insel, R.A.; Young, F.M., and Bottaro, A. Tetracyclines inhibit activated B cell function. *Int Immunol.* 2001 ; 13(7):921-31.
- Larsen, H. J.; Overnes, G.; Waldeland, H., and Johansen, G.M. Immunosuppression in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*. *Res Vet Sci.* 1994; 56(2):216-224.
- Lewis, G.E.; Huxsoll, D.L.; Ristic, M., and Johnson, A. J. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am J Vet Res.* 1975; 36(1):85-88.
- Lewis, G.E.; Ristic, M.; Smith, R.D.; Lincoln, T., and Stephenson, E.H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res.* 1977; 38(12):1953-1955.
- Liew, F.Y. Suppressor cells for cell-mediated immunity in infectious diseases. *Res Immunol.* 1989;140(3):328-333.
- Lilliehöök, I.; Egenval, A., and Tvedten, H.W. Hematopathology in dogs experimentally infected with a swedish granulocytic *ehrlichia* species. *Vet Clin Pathol.* 1998; 27(4):116-122.
- Lilliehöök, I.; Johannisson, A.; Magnusson, U.; Egenvall, A.; Trowald-Wigh, G., and Hakansson, L. Granulocyte function in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic *Ehrlichia* species. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 67:141-152.
- Liz, J.S.; Anderes, L.; Sumner, J.W.; Massung, R. F.; Gern, L.; Rutti, B., and Brossard, M. PCR detection of granulocytic *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in Western Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(3):1002-1007.
- Loken, M.R.; Brosnan, J.M.; Bach, B.A., and Ault, K.A. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry.* 1990; 11:453-459.
- Long, M.T.; Goetz, T.E.; Kakoma, I.; Whiteley, H.E.; Lock, T.E.; Holland, C.J.; Foreman, J.H., and Baker, G.J. Evaluation of fetal infection and abortion in pregnant ponies experimentally infected with *Ehrlichia risticii* . *Am J Vet Res.* 1995a; (56):1307-1316.
- Long, M.T.; Goetz, T.E.; Whiteley, H.E.; Kakoma, I., and Lock, T.E. Identification of *Ehrlichia risticii* as the causative agent of two equine abortions following natural maternal infection. *J Vet Diagn Invest.* 1995b; 7:201-205.
- Lotric-Furlan, S.; Avsic-Zupanc, T.; Petrovec, M.; Nicholson, W.L.; Sumner, J.W.; Childs, J.E., and Strle, F. Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001; 8(5):899-903.

- Loughran, T.J.; Starkebaum, G., and Aprile, J. Rearrangement and expression of T-cell receptor genes in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 1988; 71:822-824.
- Madewell, B.R. and Gribble, D.H. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J Am Vet Med Assoc*. 1982; 180(5):512-514.
- Madigan, J.E.; Hietala, S.; Chalmers, S., and DeRock, E. Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of northern California. *J Am Vet Med Assoc*. 1990; 196(12):1962-1964.
- Madigan, J.E. and Pusterla, N. Ehrlichial diseases. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2000; 16(3):487-499.
- Madigan, J.E.; Pusterla, N.; Johnson, E.; Chae, J.S.; Pusterla, J.B.; Derock, E., and Lawler, S.P. Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report. *Equine Vet J*. 2000; 32:275-279.
- Maeda, K.; Markowitz, N.; Hawley, R.C.; Ristic, M; Cox, D., and McDade, J.E. Human infection with *Ehrlichia canis* a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med*. 1987; 853-856.
- Magnarelli, L.A. and Anderson, J.F. Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in north-eastern United States. *J Clin Microbiol*. 1993 . 1993; 31(11):2857-2860.
- Magnarelli, L.A.; Ijdo, J.W., and Anderson, J.F. Antibodies to *Ehrlichia equi* in dogs from the north-eastern United States. *J Am Vet Med Assoc*. 1997; 211(9):1134-1137.
- Magnarelli, L.A.; Ijdo, J.W.; Anderson, J.F.; Padula, S.J.; Flavell, R.A., and Fikrig, E. Human exposure to a granulocytic *ehrlichia* and other tick-borne agents in Connecticut. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36(10):2823-2827.
- Magnarelli, L.A.; Van Andel, A.E.; Ijdo, J.W.; Heimer, R., and Fikrig, E. Serologic testing of horses for granulocytic ehrlichiosis, using indirect fluorescent antibody staining and immunoblot analysis. *Am J Vet Res*. 1999; 60(5):631-635.
- Makinde, M.O. and Bobade, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. *Res Vet Sci*. 1994; 57(3):343-348.
- Manian, F.A.; Weidner, J., and Costello, J. Human ehrlichiosis. *Mo Med*. 1989; 86:691-695.
- Mansueto, S.; D'Ancona, F. P.; Colletti, P.; Graceffa, R.; La Seta, F.; Pecoraro, V.; Gambino, G.; Grillo, G.; Vitale, G.; Richiusa, P.; D'Agostino, P., and Cillari, E. Alteration of interleukin-2 (IL-2) and soluble IL-2 receptor secretion in the sera and urine of patients with rickettsial boutonuse fever. *J Infect Dis*. 1997; 175(1):142-145.
- Maretzki, C.H.; Fisher, D.J., and Greene, C.E. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1994; 205(11):1554-1556.
- Martin, G.S.; Christman, B.W., and Standaert, S.M. Rapidly fatal infection with *Ehrlichia chaffeensis*. *N Engl J Med*. 1999; 341:763-764.
- Martinez-Moreno, A.; Moreno, T.; Martinez-Moreno, F.J.; Acosta, I., and Hernandez, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995 Oct;48(3-4):209-20.
- Marty, A.M.; Dumler, J.S., and Imes, G. Ehrlichiosis mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: case report and pathological correlation. *Hum Pathol*. 1995; 26:920-925.

- Massung, R.F.; Owens, J.H.; Ross, D.; Reed, K.D.; Petrovec, M.; Bjoersdorff, A.; Coughlin, R.T.; Beltz, G.A., and Murphy, C.I. Sequence analysis of the ank gene of granulocytic *ehrlichiae*. J Clin Microbiol. 2000; 38(8):2917-2922.
- Matthewman, L.A.; Kelly, P.J.; Mahan, S.M.; Semu, S.M.; Mason, P.R.; Bruce, D.; Brouqui, P., and Raoult, D. Reactivity of sera collected from dogs in Mutare, Zimbabwe, to antigens of *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. Vet Rec. 1994a; 134(19):498-499.
- Matthewman, L.A.; Kelly, P.J.; Brouqui, P., and Raoult, D. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. J S Afr Vet Assoc. 1994b; 65(3):104-107.
- Matus, R.E.; Leifer, C.E., and Hurvitz, A.I. Use of plasmapheresis and chemotherapy for treatment of monoclonal gammopathy associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1987; 190(10):1302-1304.
- McBride, J.W.; Corstvet, R.E.; Gaunt, S.D.; Chinsangaram, J.; Akita, G.Y., and Osburn, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Vet Diagn Invest. 1996; 8(4):441-447.
- McDevitt, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. Annu Rev Immunol. 2000; 18:1-17.
- McDonough, S.P. and Moore P.F. Clinical, hematologic and immunophenotypic characterization of canine granular lymphocytosis. Vet Pathol. 2000; 37(6):637-646.
- McKoy, J.P.Jr. Basic principles in clinical flow cytometry. In Keren DF, Hanson, CA, Hartubise PE (Eds): Flow Cytometry and Clinical Diagnosis. Chicago, American Society of Clinical Pathologists . 1994; 26.
- McQuiston, J.H.; Paddock, C.D.; Holman, R.C., and Childs, J.E. Human ehrlichiosis in the United States. Emerg Infect Dis. 1999; 5:635-642.
- Meinkoth, J.H.; Ewing, S.A.; Cowell, R.L.; Dawson, J.E.; Warner, C.K.; Mathew, J.S; Bowles, M; Thiessen, A.E; Panciera, R.J., and Fox, C. Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. J Vet Intern Med. 1998; 12(5):389-393.
- Meinkoth, J.H and Clinkenbeard, D.C. Normal hematology of the dog. En: Schalm's Veterinary Hematology, 5th Ed. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (Eds). Baltimore. 2000.
- Mendonca, S.C.; De Luca, P.M.; Mayrink, W.; Restom, T.G.; Conceicao-Silva, F.; Da-Cruz, A.M.; Bertho, A.L.; Da Costa, C.A.; Genaro, O., and Toledo, V.P. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53(2):195-201.
- Messick J.B., and Rikihisa Y. Suppression of Ia antigen expression on gamma interferon treated macrophages infected with *Ehrlichia risticii*. Vet Immunol Immunopathol. 1992;32(3-4):225-241.
- Messick J.B. and Rikihisa Y. Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization , and proliferation in host cells by flow cytometry. Infect Immun. 1993; 61(9):3803-3810.
- Messick J.B. and Rikihisa Y. 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. 1994; 62(8):3156-3161.

- Misao, T and Kobayashi, Y. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of patients with infectious mononucleosis using mice. *Kiushu J Med Sci.* 1955; 6:145-152.
- Misao, T. and Kobayashi, Y. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). 1. Isolation of the etiological agent from blood, bone marrow and lymph nodes of a patient infected with infectious mononucleosis by using mice. *Kyushu J. Med. Sci.* 1987; 155:1059-1062.
- Moore, P.F; Rossitto, P.V.; Danilenke, D.M.; Wielenga, J.J.; Raff, R.F., and Severns, E. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens* . 1992; 40:75-85.
- Morais, D.; Dawson, J.E.; Greene, C.; Filipe, A.R.; Galharda, L.C., and Bacellar, F. First european case of ehrlichiosis. *Lancet.* 1991; 338:633-634.
- Morales, M.; Mateu, C., and Guitart, P. Seroprevalencia de ehrlichiosis y rickettsiosis. Libro de Resúmenes del XXXV Congreso Nacional de AVEPA. Madrid. 2000.
- Moreno, J.A. and Estrada-Peña, A. Prevalence and seasonal activity of *Ixodes ricinus* on domestic ruminants of the Basque country, Spain. *Exp Appl Acarol* . 1997; 21(1):41-48.
- Moreno, J.; Nieto, J.; Chamizo, C.; González, F.; Blanco, F.; Barker, D.C., and Alvar, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis, before and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 71:181-195.
- Moshkovski, S.D. Cytotropic inducers of infection and the classification of the *Rickettsiae* with *Clamydozoa*. *Adv Mod Biol (Moscow).* 1945; 19:1-44.
- Motoi, Y.; Satoh, H.; Inokuma, H.; Kiyuuna, T.; Muramatsu, Y.; Ueno, H., and Morita, C. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* 2001; 45(1):89-91.
- Moulder, J.W. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991; 55(1):143-190.
- Murnaghan, M.F. and O'Rourke, F.J. Tick paralysis. In Bettini, S. (ed): *Arthropod Venoms*. New York: Springer-Verlag; 1978; p. 419.
- Murphy, G.L; Ewing, S.A.; Whitworth, L.C.; Fox, J.C., and Kocan, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol.* 1998; 79:325-339.
- Mylonakis, M.E.; Koutinas, A.F.; Billinis, C.; Leontides, L.S.; Kontos, V.; Papadopoulos, O.; Rallis, T., and Fytianou, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol.* 2003; 91:197-204.
- Müller, I.; Pedrazzini, T.; Kropf, P.; Louis, J., and Milon, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Intern Immunol.* 1991; 3:587-597.
- Müller, I.; Kropf, P.; Etges, R.J., and Louis, J.A. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect Immun.* 1993; 61(9):3730-3738.
- Müller, I.; Kropf, P.; Louis, J.A., and Milon, G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun.* 1994; 62(6):2575-1581.

- Nadelman, R.B.; Horowitz, H.W., and Hsieh, T.C. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med.* 1997; 337:27-30.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes; tentative guideline. NCCLS, Villanova PA. Vol 12 No 6. 1992; NCCLS Document H42-T.
- Neer, T.M. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. Greene, G.E., editor. *Infectious diseases of the dog and the cat.* 2 ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1998; pp. 139-149.
- Neer, T.M.; Eddlestone, S.M.; Gaunt, S.D., and Corstvet, R.E. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *J Vet Intern Med.* 1999; 13(5):501-504.
- Neer, T.M.; Breitschewerdt, E.B., and Green, R.T. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med.* 2002; 16(3):309-315.
- Nims, R.M.; Ferguson, J.A.; Walker, J.S.; Hildebrandt, P.K.; Huxsoll, D.L.; Reardon, M.J.; Varley, J.E.; Kolaja, G.J.; Watson, W.T.; Shroyer, E.L.; Elwell, P.A., and Vacura, G.W. Epizootiology of tropical canine pancytopenia in Southeast Asia. *J Am Vet Med Assoc.* 1971; 158:53-63.
- Novotney, C.; English, R.V.; Housman, J.; Davidson, M.G.; Nasisse, M.P.; Jeng, C.R.; Davis, W.C., and Tompkins, M.B. Lymphocyte populations changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS.* 1990; 4:1213-1218.
- Nyindo, M.; Huxsoll D.L.; Ristic, M.; Kakoma, I.; Brown, J.L.; Carson, C.A., and Stephenson, E.H. Cell-mediated and humoral immune responses of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res.* 1980; 41(2):250-254.
- Nyindo, M.; Kakoma, I., and Hansen, R. Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of protein immunoblot. *Am J Vet Res.* 1991; 52(8):1225-1230.
- Ogunkoya, A.B.; Adeyanju, J.B., and Aliu, Y.O. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *J Small Anim Pract.* 1981; 22(12):775-777.
- Olano, J.P.; Masters, E.; Hogrefe, W., and Walker, D.H. Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(12):1579-1586.
- Olmeda, S.; Martín, R.; Rupérez, C.; Badiola, C.; Montes, C., and Miró, G. Estudio epidemiológico de las parasitosis de perros abandonados en la provincia de Madrid. Datos preliminares. III: Ectoparasitosis. *Acta Parasitológica Portuguesa.* 1993; 1:218.
- Ostfeld, R. The ecology of Lyme disease risk. *Am Sci.* 1997; 85:338-346.
- Otani, I.; Niwa, T.; Tajima, M.; Ishikawa, A.; Watanabe, T; Tsumagari, S.; Takeishi, M., and Kanayama, K. CD56 is expressed exclusively on CD3⁺ T lymphocytes in canine peripheral blood. *J Vet Med Sci.* 2002; 64(5):441-444.
- Oteo, J.A.; Blanco, J.R.; Marínez de Atola, V., and Ibarra, V. First report of human granulocytic ehrlichiosis from Southern Europe. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(4):430-432.
- Oteo, J.A.; Gil, H.; Barral, M.; Perez, A.; Jimenez, S.; Blanco, J.R.; Martínez de Artola, V.; García-Pérez, A., and Juste, R.A. Presence of granulocytic *Ehrlichia* in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect.* 2001; 127(2):353-358.

- Owens, M.A. and Loken, M.R. Components of flow cytometric Immunophenotyping in : Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. 2002; pp. 17-43.
- Paddock, C.D.; Suchard, D.P.; Grunbach, K.L.; Hadley, W.K.; Kerschmann, R.L.; Abbey, N.W.; Dawson, J.E.; Anderson, B.E.; Sims, K.G.; Dumler, J.S., and Herndier, B.G. Brief report: fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. *N Engl J Med.* 1993; 1164-1167.
- Paddock, C.D.; Sumner, J.W.; Shore, M.; Bartley, D.C.; Elie, D.C.; Mcquade, J.G.; Martin, C.R.; Goldsmith, C.S., and Childs, J.E. Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2496-2502.
- Paddock, C.D.; Folk, S.M.; Shore, G.M.; Machado, L.J.; Huycke, M.M.; Slater, L.N.; Liddell, A.M.; Buller, R.S.; Storch, G.A.; Monson, T.P.; Rimland, D.; Sumner, J.W.; Singleton, J.; Bloch, K.C.; Tang, Y.W.; Standaert, S.M., and Childs, J.E. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2001; 33(4):1586-1594.
- Paddock, C.D. and Childs, J.E. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1):37-64.
- Palmer, J.E. and Benson, C.E. Studies on oral transmission of Potomac horse fever. *J Vet Intern Med.* 1994; 8(2):87-92.
- Pandolfi, F.; Zambello, R.; Cafaro, A., and Semenzato, G. Biologic and clinical heterogeneity of lymphoproliferative diseases of peripheral mature T lymphocytes. *Lab Invest.* 1992; 67:274-302.
- Park, J. and Rikihisa, Y. Inhibition of *Ehrlichia risticii* infection in murine peritoneal macrophages by gamma interferon, a calcium ionophore, and concanavalin A. *Infect Immun.* 1991; 59(10):3418-3423.
- Park, J. and Rikihisa, Y. L-Arginine-dependent killing of intracellular *Ehrlichia risticii* by macrophages treated with γ -interferon. *Infect Immun.* 1992; 60:3504.
- Parola, P.; Beati, L., and Cambon, M. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol.* 1998; 35(2):180-183.
- Parola, P. and Raoult, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (5):749.
- Patel, R.G. and Byrd, M.A. Near fatal acute respiratory distress syndrome in a patient with human ehrlichiosis. *South Med J.* 1999; 92(3):333-335.
- Pearce, C.J.; Conrad, M.E.; Nolan, P.E.; Fishbein, D.B., and Dawson, J.E. Ehrlichiosis: a cause of bone marrow hypoplasia in humans. *Am J Hematol.* 1988; 28:53-55.
- Pérez, M.; Rikihisa, Y., and Wen, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2133-2139.
- Perille, A.L. and Matus, R.E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *J Vet Intern Med.* 1991; 5(3):195-198.
- Perkocho, L.A. and Rodgers, G.M. Hematologic aspects of human immunodeficiency virus infection: laboratory and clinical considerations. *Am J Hematol.* 1988; 29:94-105.

- Perterson, L.R.; Sawyer, L.A.; Fishbein, D.B.; Kelley, P.W.; Thomas, R.J.; Magnarelli, L.A.; Redus, M., and Dawson, J.E. An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserve unit exposed to ticks. *J Infect Dis.* 1989; 159:562-568.
- Petrovec, M.; Lotric Furlan, S., and Avsic Zupanc, T. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:1556-1559.
- Philip, C.B.; Hadlow, W.J., and Hughes, L.E. *Neorickettsia helminthoeca*, a new rickettsia-like disease agent in dogs in western United States transmitted by an helminth. *Riass Commun VI Congr Int Microbiol, Roma.* 1953; 2:256-257.
- Piesman J. and Spielman A. Human babesiosis on Nantucket Island: Prevalence of *Babesia microti* in ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29:742-746.
- Pinelli, E.; Boog, C.J.P.; Rutten, V.P.M.G. ; Van Dijk, B.; Bernadina, W.E., and Ruitenber, E.J. A canine CD8+ cytotoxic T cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Tissue Antigens.* 1994; 43:189-192.
- Pinelli, E.; Gonzalo, R.M.; Boog, C.J.P.; Rutten, V.P.M.G.; Bebbard, D.; Del Real, G., and Ruitenber, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol.* 1995; 25:1594-1600.
- Popov, V.L.; Han, V.C.; Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Feng, H.M.; Andreadis, T.G.; Tesh, R.B., and Walker, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol.* 1998; 47:235-251.
- Price, J.E.; Sayer, P.D., and Dolan, T.T. Improved clinical approach to the diagnosis of canine ehrlichiosis. *Tropical Animal Health and Production in Africa.* 1987; 19:1-8.
- Prieto, M. Estudio sobre la incidencia de garrapatas y piroplasmosis durante 1999. Libro de Resúmenes del XXXIV Congreso Nacional de AVEPA. Barcelona. 1999; 287.
- Prieto, M. Aspectos clínicos de la babesiosis canina y de la infección simultánea por *Ehrlichia* y *Borrelia*. Libro de Resúmenes del XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA. Sevilla. 2003; 285.
- Pusterla, N.; Pusterla, J.B.; Deplazes, P.; Wolfensberger, C.; Muller, W.; Horauf, A.; Reusch, C., and Lutz, H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic *Ehrlichia* infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(12):3460-3462.
- Pusterla, N.; Leutenegger, C.M.; Huder, J.B.; Weber, R.; Braun, U., and Lutz, H. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1332-1334.
- Pusterla, N.; Madigan, J.E.; Chae, J.; Derock, E.; Johnson, E., and Pusterla, J.B. Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1293-1297.
- Quiroz, H. Ixódidos. En: *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos.* 1984; 767-802.
- Rapmund, G. Rickettsial diseases for the Far East: new perspectives. *J Infect Dis.* 1984; 149:330-338.
- Ratnasamy, N.; Everett, E.D.; Roland, W.E.; McDonald, G., and Caldwell, C.W. Central nervous system manifestations of human ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 23(2):314-319.

- Raziuddin, S.; Telmasani, A.W.; El-Awad, M.E.; El-Amari, O., and Al-Janadi, M. $\gamma\delta$ T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 1992; 22:1143-1148.
- Reardon, M.J. and Pierce, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. *Vet. Pathol.* 1981; 18:48-61.
- Reddy, G.R.; Sulsona, C.R.; Barbet, A.F.; Mahan, S.M.; Burrige, M.J., and Alleman, A.R. Molecular characterization of a 28 kDa surface antigen gene family of the tribe *Ehrlichiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247(3):336-343.
- Reed, K.D.; Mitchell, P.D.; Persing, D.H.; Kolbert, C.P., and Cameron, V. Transmission of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA.* 1995; 273-283.
- Ribeiro, J.M.C.; Makoul, G., and Levine, J. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes damming*. *J Exp Med.* 1985; 161:332.
- Ribeiro, J.M.C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann Rev Entomol.* 1987; 32 :463.
- Richards, S.J. and Scott, C.S. Human NK cells in health and disease: clinical, functional, phenotypic and DNA genotypic characteristics. *Leuk Lymphoma.* 1992; 7:377-399.
- Rikihisa, Y.; Perry, B.D., and Cords, D.O. Ultra structural study of ehrlichial organisms in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever. *Infect Immun.* 1985; 49(3):505-512.
- Rikihisa, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4:286-308.
- Rikihisa, Y.; Stills, H., and Zimmerman, G. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in a macrophage cell line. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(9):1928-1933
- Rikihisa, Y.; Ewing, S.A.; Fox, J.C.; Sidebar, A.G.; Ascribe, F.H., and Malone, M.B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(1):143-148.
- Rikihisa, Y. Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*. *Microbes Infect.* 1999; 1(5):367-376.
- Ristic, M.; Huxsoll, D.L.; Weedier, R.M.; Hildebrandt, P.K., and Nyindo, M.B. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect Immun.* 1972; 6(3):226-231.
- Ristic, M. Tick-borne rickettsias of veterinary importance with emphasis on the immunology of the disease. En: *Tick-Borne Diseases and Their Vectors*. Wilde, J.K.H. (Ed.). Edinburgh University Press. Edinburgh. 1976; 475-481.
- Ristic, M.; Huxsoll, D.L.; Tachibana, N., and Rapmund, G. Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu*. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30(6):1324-1328.
- Ristic, M. and Huxsoll, D.L. Tribe II. *Ehrlichieae* Philip 1957, 948^{AL}. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol1, Pp. 704-711. Edited by N.R. Krieg y J.G. Holt. Baltimore: Williams y Wilkins. 1984.
- Ristic, M. and Kreier, J.P. Family III. *Anaplasmataceae* Philip 1957, 980^{AL}. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol1, Pp. 719-729. Edited by N.R. Krieg y J.G. Holt. Baltimore: Williams y Wilkins. 1984.
- Ristic, M.; Dawson, J.; Holland, C.J., and Jenny, A. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). *Am J Vet Res.* 1988; 49(9):1497-1500.

- Ristic, M., Williams, J.C. and Kakoma, I. Current strategies in research on ehrlichiosis. Ehrlichiosis. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.; 1990; pp. 138-153.
- Ristic, M. and Holland, C.J. Canine ehrlichiosis. En: Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Woldehiwet, Ristic (Eds). Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. 1993; 169-186.
- Rivas, L.R. Functional and phenotypic analysis of in vitro stimulated canine peripheral blood mononuclear cells. Vet Immunol Immunopathol. 1995; 45:55-71.
- Rocha, B.; Dautigny, N., and Pereira, P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. Eur J Immunol. 1989; 19(5):905-911.
- Rohrbach, B.W.; Harkess, J.R.; Ewing, S.A.; Kudlac, J.; Mckee, G.L., and Istre, G.R. Epidemiologic and clinical characteristics of persons with serologic evidence of *E. canis* infection. Am J Pub Health. 1990; 80:442-445.
- Roitt, I. La base de la inmunología: Inmunidad innata e Inmunidad adquirida específica. En: Inmunología Fundamentos. Ivan Roitt (Eds). Editorial Médica Panamericana. 1998a.; 3-39.
- Roitt, I. El reconocimiento de los antígenos: Anticuerpos y Receptores de membrana. En: Inmunología Fundamentos. Ivan Roitt (Eds). Editorial Médica Panamericana. 1998b.
- Rosell, A.I. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión celular en la leucemia linfática crónica y otros síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica. Tesis Doctoral. Universidad De Valencia (Ed). 2002; 64-65.
- Russo, D.M.; Armitage, R.J.; Barral-Netto, M.; Barral, A.; Grabstein, K.H., and Reed, S.G. Antigen-reactive $\gamma\delta$ T cells in human leishmaniasis. J Immunol. 1993; 151:3712-3718.
- Sacks, D.L.; Lal, S.L.; Shrivastava, S.N.; Blackwell, J., and Neva, F.A. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. J Immunol. 1987; 138(3):908-913.
- Sadikot, R.; Shaver, M.J., and Reeves, W.B. *Ehrlichia chaffeensis* in a renal transplant recipient. Am J Nephrol. 1999; 19:674-676.
- Sagredo, P.; Fraile, C.; Sainz, A.; Rupérez, C.; Tesouro, M., and González, J.L. Skin lesions associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. Proceedings 11th Annual Congress European Society of Veterinary Dermatology. Bordeaux. 1994.
- Sainz, A.; Tesouro, M.A.; Rodríguez, F., and Mazzucchelli, F. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain. Preventive Vet Med. 1995; 23:179-182.
- Sainz, A. Aspectos clínicos y epizootológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (Ed). 1996.
- Sainz, A.; Delgado, S.; Amusatogui, I.; Tesouro, M.A., and Cármenes, P. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (NW Spain). Preventive Veterinary Medicine. 1996; 29:1-7.
- Sainz, A.; Amusatogui, I., and Tesouro, M.A. Canine ehrlichiosis in the Comunidad de Madrid (Central Spain). Annals of New York Academy of Sciences. 1998a; 849:438-440.
- Sainz, A.; Muñoz, M.C.; Montoya, J.A.; Amusatogui, I., and Tesouro, M.A. Estudio de seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros de la isla de Gran Canaria (España). IV Simposium Ibérico Sobre *Ixodoidea* y Enfermedades Transmitidas. Setubal (Portugal) 24-26 de Septiembre. 1998b.

- Sainz, A.; Kim, C.H.; Tesouro, M.A.; Hansen, R.; Amusatogui, I.; Koo, H.Y., and Kakoma, I. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia risticii* in dogs in Spain. Proceedings 5th Conference Society for Tropical Veterinary Medicine. Florida (USA). 1999a.
- Sainz, A.; Amusatogui, I, and Tesouro, M.A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. J Vet Diagn Invest. 1999b; 11(4):382-384.
- Sainz, A.; Amusatogui, I.; Kakoma, I.; Rodríguez, F., and Tesouro, M.A. Estudio sobre la presencia de anticuerpos frente a diferentes *Ehrlichia spp*, en perros de la zona centro de España. Libro De Ponencias y Comunicaciones. XXXV Congreso Nacional De AVEPA. Madrid 12-15 Octubre. 2000a.
- Sainz, A.; Tesouro, M.A.; Hansen, R.; Amusatogui, I.; Hyun-Young, K., and Kakoma, I. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia* species in dogs in Spain. Ann N Y Acad Sci. 2000b; 916:635-642.
- Sainz, A.; Tesouro, M.A., and Amusatogui, I. Prospective comparative study of three treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. J Vet Intern Med . 2000c; 14(2):134-139.
- Sainz, A. and Tesouro, M.A. Alteraciones Biopatológicas: Hematología, Bioquímica Sanguínea, Urianálisis. En: Ehrlichiosis. Canis Et Felis. 2001; 51:41-48.
- Sakai, M.; Otani, I.; Watari, T.; Sato, T.; Kanayama, K.; Takeuchi, A., and Hasegawa, A. Phenotypic analysis of hepatic lymphocytes from healthy dogs. J Vet Med Sci. 2003; 65(1):157-159.
- Sauer, J.R.; Mane, S.D., and Smichmidt, S.P. 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. 1986; 55.
- Saz, J.V.; Dawson , J.E.; Bacellar, F.; Merino, F.J., and Filipe, A.R. Human ehrlichiosis in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1994; 12(7):357-358.
- Scharton, T.M. and Scott, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cells subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. J Exp Med. 1993; 178.
- Schwartz, I.; Fish, D., and Daniels, T.J. Prevalence of the rickettsial agent of human granulocytic ehrlichiosis in ticks from a hyperendemic focus of Lyme disease. N Engl J Med. 1997; 337:49-50.
- Scott, C. and Richards, S. Classification of large granular lymphocyte (LGL) and NK-associated (NKa) disorders. Blood Rev. 1992; 6 :220-233.
- Scott, D.W.; Miller, W.H., and Griffin, G.E. Small Animal Dermatology. Diagnostic Methods. 6th ed. W.B. Saunders Company; 2001; pp. 93-94.
- Sellon, R.K. Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease . Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2003; 33(4):677-693.
- Shanahan, T. Application of flow cytometry in transplantation medicine. Immunological Investigation. 1997; 26:91-101.
- Shaw, D.H. and Rubin, S.I. Pharmacologic activity of doxycycline. J Am Vet Med Assoc. 1986; 189(7):808-810.

- Shaw, S. Ehrlichiosis and Anaplasmosis. Tijdsch Diergeneeskd. 2003; 128(11): 353-354.
- Silverstein, A.M. On the naming of *Rickettsiae* after Paul Ehrlich. Bull Hist Med. 1998; 72:731-733.
- Simpson, T.M.; Gaunt, S.D.; Hair, J.A.; Kocan, K.M.; Henk, W.G., and Casey, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. Am J Vet Res. 1991; 52(9):1537-1541.
- Skotarczak, B. Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med. 2003. 2003; 10(2):137-141.
- Slappendel, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. Vet Q. 1988; 10(1):1-16.
- Sloand, E.M.; Klein, H.G., and Banks, S.M. Epidemiology of thrombocytopenia in HIV infection. Eur J Haematol. 1992; 48:168-172.
- Smith, R.D.; Sells, D.M.; Stephenson, E.H.; Ristic, M, and Huxsoll, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic *Rickettsia*. Am J Vet Res. 1976; 37(2):119-126.
- Smyth, M.J. and Trapini, J.A. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. Immunol Today. 1995; 16:202-206.
- Sonea, I.M.; Jergens, A.E; Sacco, R.E.; Niyo, Y.; Merten, E.; Kauffman, L.K, and Moore, P.F. Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog. Vet Immunol Immunopathol. 2000; 77:103-119.
- Sood, S.; Salzman, M.B., and Johnson, B.J.B. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. J Infect Dis. 1997; 175:996-999.
- Stewart, C.C. Identification and function of host defense cells by flow cytometry. Immunological Investigations . 1997; 26:83-89.
- Stone, B.F. Tick paralysis, particularly involving *Ixodes holocyclus* and other *Ixodes* species. Biology of ticks: Harris KF (ed). Current Topics in Vector Research. New York: Springer Verlag; 1988; p. 61.
- Stone, B.F.; Binnington, K.F., and Gauci, M. Tick/host interactions for *Ixodes holocyclus*: Role, effects, biosynthesis and nature of its toxics and allergenic oral secretions. Experimental and Applied Acarology. 1989; 7:59.
- Stone, M.; Fortin, P.R.; Pacheco-Tena, C., and Inman, R.D. Should tetracycline treatment be used more extensively for rheumatoid arthritis? Metaanalysis demonstrates clinical benefit with reduction in disease activity. J Rheumatol. 2003; 30(10):2085-2097.
- Suksawat, J.; Pitulle, Ch.; Arraga-Alvarado, C.; Madrigal, K.; Hancock, S.I., and Breitschwerdt, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(1):90-93.
- Sumner, J.W.; Nicholson, W.L., and Massung, R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol. 1997; 35:2087-2092.
- Tarello, W. Canine granulocytic ehrlichiosis (CGE) in Italy. Acta Vet Hung. 2003; 51(1):73-90.

- Tatchell, R.J. Salivary secretion in the cattle tick as a means of water elimination. *Nature*. 1967; 213:940.
- Tatchell, R.J. The ionic regulatory role of the salivary secretions of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Journal of Insect Physiology*. 1969; 15:1421 .
- Tatchell, R.J. and Moorhouse, D.E. Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. *Science*. 1970; 167:1002.
- Taylor, A.W.; Holman, H.H., and Gordon, W.S. Attempts to reproduce the pyaemia associated with tick-borne fever. *Vet Rec*. 1941; 24:337-344.
- Telford, S.R.; Dawson, J.E.; Katavolos, P.; Warner, C.K.; Kolbert, C.P., and Persing, D.H. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:6209-6214.
- Tesouro, M.A. Aspectos clínicos y laboratoriales de la leishmaniosis canina. Estudio espizootológico en la provincia de Madrid. 1984. Tesis doctoral. Madrid.
- Tesouro, M.A.; Amusatogui, I.; Mazzuchelli, F.; Sainz, A., and Rodriguez, F. Tratamientos actuales. En: Tratamiento de la leishmaniosis canina. Encuesta epizootológica en la Comunidad Autónoma de Madrid, pp. 7-54. Ed. Por Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, Madrid 28009, 1995.
- Tesouro, M.A.; Amusatogui, I.; Rodríguez, F.; Alonso, A.; Miró, G., and Sainz, A. Detección de anticuerpos frente a *E. canis* en sangre de gatos de la zona centro de España (Madrid). *Proceedings IV SISJET*. Setúbal (Portugal). 1998.
- Tesouro, M.A. and Sainz, A. Profilaxis, Ehrlichiosis canina en España. *Canis Et Felis*. 2001; 51:65-71.
- Theiler, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In Report to the Government, Transvaal, South Africa. *Veterinary Bacteriology, Dept of Agriculture 1908-1909*. 1910; 7-64.
- Theis, J.H. and Budwiser, P.D. *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropod interface. *Exp Parasitol*. 1997; 36(1):77-105.
- Titus, R.G.; Ceredig, R.; Cerottini, J.C., and Louis, J.A. Therapeutic effect of anti-L3T4+ monoclonal antibody GK1-5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. *J Immunol*. 1985; 135:2108-2114.
- Tompkins, M.B.; Nelson, P.D., and English, R.V. Early events in the immunopathogenesis of feline retroviral infections. *J Am Vet Med Assoc*. 1991; 199:1311-1313.
- Troy, G.C.; Vulganot, J.C., and Turnwalt, G.H. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1980; 16:181-187.
- Troy, G.C. and Forrester, S.D. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, and *E. risticii* infections. En: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C.E. Greene (Ed.). W.B. Saunders. Philadelphia. 1990; 404-414.
- Tyzzar, E.E. *Cytoecetes microti* n. gen. n.sp. A parasite developing in granulocytes and infection in small rodents. *Parasitology*. 1938; 30:242-257.
- Uhaa, I.J.; McLean, J.D.; Greene, C.R., and Fishbein, D.B. A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: clinical and laboratory findings. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 46:161-164.

- Uilenberg, G.; Dobbelaere, D.A.; de Gee, A.L., and Koch, H.T. Progress in research on tick-borne diseases: theileriosis and heartwater. *Vet Q.* 1993; 15(2):48-54.
- Unver, A.; Perez, M.; Orellana, N.; Huang, H., and Rkihisa, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(8):2788-2793.
- Van der Kolk, J.H.; Van der Wijden, M.W., and Jongejan, F. Equine granulocytic ehrlichiosis (EGE), a review. *Tijdschr Diergeneeskd.* 1993; 118(7):227-229.
- Van Dobbenburgh, A.; Van Dam, A.P., and Fikrig, E. Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe. *N Engl J Med.* 1999; 340:1214-1216.
- Van Heerden, J. and Immelman, A. The use of doxycycline in the treatment of canine ehrlichiosis. *J S Afr Vet Assoc.* 1979; 50(4):241-244.
- Van Heerden, J. and Van Heerden, A. Attempted treatment of canine ehrlichiosis with imidocarb dipropionate. *J S Afr Vet Assoc.* 1981; 52(3):173-175.
- Vugia, D.J. and Kramer, V.L. A human case of monocytic ehrlichiosis with adult respiratory distress syndrome in northern California. *West J Med.* 1996; 164(6):525-528.
- Waddle, J.R. and Littman, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1988; 24:615-620.
- Walker, J.B. and Olwage, A. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (*Ixodoidea*, *Ixodidae*, genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort J Vet Res.* 1987; 54(3):353-379.
- Waner, T.; Harrus, S.; Weiss, D.J.; Bark, H., and Keysary, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 48(1-2):177-182.
- Waner, T.; Rosner, M.; Harrus, S.; Naveh, A.; Zass, R., and Keysary, A. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol.* 1996; 63(3-4):331-335.
- Waner, T.; Leykin, I.; Shinitzky, M.; Sharabani, E.; Buch, H.; Keysary, A.; Bark, H., and Harrus, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000a; 77:145-150.
- Waner, T.; Strenger, C., and Keysary, A. 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.* 2000b; 12(3):240-244.
- Waner, T.; Harrus, S.; Jongejan, F.; Bark, H.; Keysary, A., and Cornelissen, A.W. 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.* 2001; 95(1):1-15.
- Weaver, R.A.; Virella, G., and Weaver, A. Ehrlichiosis with severe pulmonary manifestations despite early treatment. *South Med J.* 1999; 92(3):336-339.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173(2):697-703.
- Weiser, M.G.; Thrall, M.A., and Fulton, R. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1991; 27:84-88.

- Weisiger, R.M.; Ristic, M., and Huxsoll, D.L. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by indirect fluorescent antibody method. *Am J Vet Res.* 1975; 36(5):689-694.
- Weiss, D.J. Evaluation of monoclonal antibodies for identifications of subpopulations myeloid cells in bone marrow obtained from dogs. *Am J Vet Res.* 2001a; 62(8):1229-1233.
- Weiss, D.J. Evaluation of proliferative disorders in canine bone marrow by use of flow cytometric scatter plots and monoclonal antibodies. *Vet Pathol.* 2001b; 38(5):512-518.
- Weiss, D.J. Flow cytometric and immunophenotypic evaluation of acute lymphocytic leukemia in dog bone marrow. *J Vet Intern Med.* 2001c; 15:589-594.
- Weiss, D.J. Use of monoclonal antibodies to refine flow cytometric differential counting of canine bone marrow cells. *Am J Vet Res.* 2001d; 62(8):1273-1278.
- Weiss, D.J. Flow cytometric evaluation of hemophagocytic disorders in canine. *Vet Clin Pathol.* 2002; 31(1):36-41.
- Wellman, M.; Couto, C.; Starkey, R., and Rojko, J. Lymphocytosis of large granular lymphocytes in three dogs. *Vet Pathol.* 1989; 26:158-163.
- Wells, M.Y. and Rikihisa, Y. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infect Immun.* 1988 Dec;56(12):3209-3215.
- Wen, B.; Rikihisa, Y.; Mott, J.; Fuerst, P.A.; Kawahara, M., and Suto, C. *Ehrlichia muris* sp. nov. identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45:250-254.
- Wen, B.; Cao, W., and Pan, H. *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases in China. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 990:45-53.
- Whist, S.K.; Storset, A.K., and Larsen, H.J.S. Functions of neutrophils in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 86(3-4):183-193.
- Whist, S.K.; Storset, A.K.; Johansen, G.M., and Larsen, H.J. Modulation of leukocyte populations and immune responses in sheep experimentally infected with *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) *phagocytophilum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 94(3-4):163-175.
- Williams, D.L. Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *Vet J.* 1997; 153:31-39.
- Williams, N.M.; Cross, R.J., and Timoney, P.J. Respiratory burst activity associated with phagocytosis of *Ehrlichia risticii* by mouse peritoneal macrophages. *Res Vet Science.* 1994; 57(2):194-199.
- Williams, R.C.; Koste, F.T., and Kilpatrick, K.A. Alterations in lymphocyte cell surface markers during various human infections. *Am J Med.* 1983; 75:807-810.
- Wiltrout, R.H. Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. *Immunol Rev.* 2000; 174:63-76.
- Winnicka, A.; Jagielski, D.; Hoffmann-Jagielska, M., and Lechowski, R. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *J Vet Med.* 2002; 49:303-306.

- Winslow, G.M.; Yager, E.; Shilo, K.; Volk, E.; Reilly, A., and Chu, F.K. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. *Infect Immun.* 2000; 2187-2195.
- Woese, C.R.; Kandler, O., and Wheelis, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(12):4576-4579.
- Woldehiwet, Z. and Scott, G.R. Tick-borne fever: leucocyte migration inhibition. *Vet Microbiol.* 1982a; 7(5):437-445.
- Woldehiwet, Z. and Scott, G.R. Immunological studies on tick-borne fever in sheep. *J Comp Pathol.* 1982b; 92(3):457-467.
- Woldehiwet, Z. Depression of lymphocyte response to mitogens in sheep infected with tick-borne fever. *J Comp Pathol.* 1987; 97(6):637-643.
- Woldehiwet Z. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. *Research in Veterinary Science.* 1991; 51(1):40-43.
- Wolf, L.; McPherson, T.; Harrison, B.; Engber, B.; Anderson, A., and Whitt, P. Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:2795.
- Wong, S.J. and Thomas, J.A. Cytoplasmatic, Nuclear and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. *J Clin Microbiol.* 1998; 1959-1963.
- Woody, B.J and Hoskins, J.D . Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract.* 1991; 21(1):75-98.
- Young, D.R.; Davis, W., and Arther, R.G. Evaluation of K9 Advantix versus Frontline Plus topical treatments to repel brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2003; 25 (supl):19-21.
- Yu, X.; McBride, J.W.; Diaz, C.M., and Walker, D.H. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):369-374.
- Zhang, Y.; Ohashi, N.; Lee, E.H.; Tamura, A., and Rikihisa, Y. *Ehrlichia sennetsu* groE operon and antigenic properties of the GroEL homolog. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997; 18:39-46.