

LA STORIA SEMPRE PIÙ COMPLICATA DI EHRLICHIA*

DIANE E. PREZIOSI¹, DVM, DABVP

LEAH A. COHN, DVM, PhD, DACVIM

University of Missouri-Columbia

¹ Il Dr. Preziosi è attualmente affiliato alla University of Pennsylvania

Riassunto

L'erlichiosi, una volta considerata una malattia rara negli Stati Uniti, sta diventando sempre più comune in molte regioni del Paese. Anche se *Ehrlichia canis* è stata la prima specie descritta e resta quella meglio conosciuta, attualmente sono note molte altre specie di *Ehrlichia* capaci di infettare il cane. Il riconoscimento di altri tipi di infezione sostenuti da microrganismi appartenenti a questo genere ha aggiunto complessità alla diagnosi della malattia. L'importanza di questi agenti patogeni è aumentata con il riconoscimento dell'erlichiosi umana.

Summary

Ehrlichiosis, once viewed as a rare disease in the United States, has become an increasingly common diagnosis in many regions of the country. Although Ehrlichia canis was the first species described and remains the best understood, many other species of Ehrlichia are now known to infect dogs. The recognition of new types of ehrlichial infections has added complexity to the diagnosis of ehrlichiosis. The importance of these pathogens has increased with the recognition of human ehrlichiosis.

L'infezione da *Ehrlichia* venne riconosciuta per la prima volta come causa di malattia nel cane in Algeria nel 1935 circa.¹ I veterinari degli Stati Uniti non ebbero familiarità con la malattia fino alla guerra del Vietnam, quando i cani da lavoro militari, compresi molti che non avevano mai lasciato il Paese, svilupparono quella che era nota all'epoca come pancitopenia tropicale causata da *Ehrlichia canis*.^{2,3} Da allora sono state identificate altre specie di *Ehrlichia* capaci di causare malattia nel cane. La classificazione di tali specie è stata riorganizzata, le opzioni relative ai test diagnostici sono aumentate e sono state riconosciute ulteriori manifestazioni dell'erlichiosi in un'area geografica più ampia. A metà degli anni '80, negli Stati Uniti venne riconosciuta una specie di *Ehrlichia* capace di causare la malattia nell'uomo; da allora, anche varie altre specie sono state riscontrate in grado di infettare l'uomo. Alcune erlichie che colpiscono il cane possono infettare anche l'uomo (attraverso i morsi di zecche), facendo sorgere la preoccupazione circa il ruolo dei cani come ospiti di una potenzia-

le zoonosi. Il presente lavoro prende in considerazione questi sviluppi e la loro importanza nella comprensione, nella diagnosi e nel trattamento dell'erlichiosi, principalmente nel cane.

CLASSIFICAZIONE

Gli appartenenti al genere *Ehrlichia* sono batteri intracellulari obbligati Gram-negativi privi di endotossine lipopolisaccaridiche e che si basano su vettori artropodi per la trasmissione. Per molti anni, *E. canis* è stata l'unica specie di *Ehrlichia* nota come causa di malattia nel cane ed è di gran lunga la meglio descritta fra le erlichie patogene di interesse veterinario. Attualmente, sono state riconosciute diverse altre specie di *Ehrlichia* che infettano il cane, sia come agenti primari che come ospiti incidentali. In passato sono stati formulati degli schemi di classificazione basati sul tipo di cellula infettata da parte delle erlichie. Benché tali schemi siano di provata utilità, parecchie specie, come *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia risticii* ed *Ehrlichia phagocytophila* possono infettare più di un tipo cellulare.^{4,5} Gli attuali schemi di classificazione sono basati sull'analisi genetica della sequenza del gene del-

*Da "The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian", Vol. 24, N. 4, aprile 2002, 277. Con l'autorizzazione dell'Editore.

l'rRNA 16S del microrganismo. Questo metodo consente di dividere le varie specie in tre genogruppi, i membri di ciascuno dei quali danno comunemente origine a reazioni crociate dei titoli anticorpali.⁵⁻⁸ Nonostante la stretta correlazione genetica, le singole specie all'interno di un genogruppo possono infettare cellule differenti nei vari ospiti, utilizzando vettori diversi ed avendo una distribuzione geografica differente (Tab. 1).

EPIDEMIOLOGIA

Benché non siano stati descritti i vettori specifici per ciascuna specie di *Ehrlichia*, nella maggior parte dei casi queste si basano su un artropode per la propria trasmissione. Il quadro di distribuzione geografica delle varie specie di *Ehrlichia* è correlato alla presenza dei relativi vettori. Quello predominante per *E. canis* è la zecca bruna del cane (*Rhipicephalus sanguineus*), che ha diffusione mondiale.^{9,10} Di conseguenza, *E. canis* è stata segnalata in cani di Africa, Europa, Asia, Medio Oriente e Stati Uniti. A differenza di *E. canis*, *E. ewingii* è nota per utilizzare almeno tre vettori differenti. Oltre a *R. sanguineus*, questa infezione può essere trasmessa da *Dermacentor variabilis* (zecca del cane americano) ed *Amblyomma americanum* (zecca della stella solitaria).¹⁰ La distribuzione primaria di quest'ultima corrisponde agli Stati Uniti medio occidentali e sud orientali e può spiegare l'aumento dell'incidenza dell'infezione da *E. ewingii* in queste regioni.^{5,6,10} L'infezione da *Ehrlichia equi*, che viene trasmessa dal genere *Ixodes*, viene descritta nella maggior parte dei casi nella parte settentrionale degli Stati Uniti medio occidentali e Nord orientali.^{7,11,12}

Oltre alle zecche, altri vettori noti delle infezioni da erlichie sono le chiocciole ed i distomi. *E. risticii*, l'agente eziologico della *potomac horse fever*, viene trasmesso attraverso l'ingestione di chiocciole e può causare l'infezione sia nel cane che nel cavallo.¹³ Benché spesso non sia considerata come una specie di *Ehrlichia*, *Neorickettsia helminthoeca*, l'agente eziologico della malattia dell'avvelenamento da salmone (*salmon poisoning*), appartiene allo

stesso genogruppo di *E. risticii*. Durante un ciclo vitale complesso, si trasmette ai cani attraverso l'ingestione di distomi ospitati in certi tipi di pesce.¹⁴ I vettori di alcune specie di *Ehrlichia* che colpiscono il cane restano del tutto da definire.

È possibile un'infezione concomitante da agenti patogeni multipli veicolati da artropodi, che può contribuire ai quadri di malattia descritti in alcuni cani *Ehrlichia*-positivi. Nei cani in cui si riscontra la presenza di una zecca è probabile che ve ne siano parecchie (sia della stessa specie che di specie differenti). Inoltre, lo stesso artropode può fungere da vettore di trasmissione di più generi e specie di agenti infettivi. Ad esempio, *R. sanguineus* è in grado di trasmettere non solo *E. canis* ed *E. ewingii*, ma anche *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*.^{2,10,15-17} Le zecche del genere *Ixodes*, vettori competenti per la trasmissione di *E. equi* e dell'agente della erlichiosi granulocitaria umana (HGE), possono anche veicolare l'infezione da *Borrelia burgdorferi* e *Babesia microti*.¹⁸⁻²¹ Oltre ai molti casi descritti in letteratura relativi a queste infezioni concomitanti, indagini sierologiche hanno documentato l'esistenza di casi analoghi su larga scala. In uno di questi studi,⁶ quasi nel 50% dei cani in cui è stata diagnosticata un'infezione da *Ehrlichia* è stata riscontrata la presenza di *Bartonella gibsoni*. È stata anche documentata una concomitante positività da *B. burgdorferi* ed *E. canis*.¹⁸ Queste infezioni simultanee possono peggiorare la gravità della malattia osservata ed influire sull'esito del trattamento.

TRASMISSIONE E PATOGENESI

La trasmissione e la patogenesi dell'erlichiosi canina sono meglio note per l'infezione da *E. canis*. Questi microrganismi penetrano negli animali colpiti attraverso le secrezioni salivari durante il morso di una zecca infetta.⁴ Questa a sua volta contrae il microrganismo durante il proprio stadio larvale o ninfa quando si alimenta su un canide infetto. L'infezione si diffonde quando la zecca compie un nuovo pasto su un altro ospite. Poiché non avviene una trasmissione transovarica, l'artropode vettore non può

Tabella 1
Ehrlichie note per la capacità di infettare il cane

Tipo	Cellule bersaglio	Ospite principale	Vettore noto
Genogruppo I			
<i>Ehrlichia canis</i>	Cellule mononucleari	Cane	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Cellule mononucleari	Uomo	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Granulociti	Cane	<i>R. sanguineus</i> , <i>A. americanum</i> , <i>D. variabilis</i>
Genogruppo II			
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	Granulociti	Ruminanti	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Ehrlichia equi</i>	Granulociti	Equidi	<i>I. ricinus</i> , <i>Ixodes pacificus</i>
Agente dell'erlichiosi granulocitaria umana	Granulociti	Uomo	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. pacificus</i>
<i>Ehrlichia platys</i>	Piastrine	Cane	<i>R. sanguineus</i>
Genogruppo III			
<i>Ehrlichia risticii</i>	Monociti, enterociti	Equidi	Artropodi
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	Monociti	Cane	Distomi

fungere da serbatoio di malattia.⁴ Tuttavia, le zecche possono rimanere infette per lunghi periodi, consentendo la trasmissione della malattia all'inizio della primavera dopo aver superato l'inverno.

Il decorso dell'infezione clinica da *E. canis* viene tradizionalmente distinto in tre stadi, di durata variabile, che possono essere difficili da differenziare nelle infezioni naturali.^{4,22,23}

Fase acuta

La fase acuta si ha 1-3 settimane dopo che il cane è stato morso da una zecca infetta.⁹ Durante questa fase, il microrganismo invade i leucociti e si divide per formare morule, che sono colonie legate da una membrana vacuolare. Di solito una data specie di *Ehrlichia* invade di preferenza i leucociti mononucleari o granulocitari. *E. canis*, *E. chaffeensis* ed *E. risticii* colpiscono gli elementi mononucleari, mentre *E. ewingii*, *E. phagocytophila* ed *E. equi* si localizzano nei granulociti neutrofili o eosinofili (Tab. 1). Durante l'infezione acuta, la più costante alterazione ematologica è lo sviluppo di una trombocitopenia.²⁴ Questa alterazione multifattoriale deriva da un'inflammatione dell'endotelio vascolare con conseguente consumo di piastrine, distruzione immunomediata delle stesse e loro sequestro nella milza.^{9,24,25} È interessante notare che la trombocitopenia sembra essere un riscontro comune durante l'infezione da qualsiasi specie di *Ehrlichia* descritta sinora. Oltre alla trombocitopenia, l'infezione da *E. canis* può essere accompagnata da trombocitopenia.²⁶ L'iperglobulinemia durante l'infezione acuta da *E. canis* è di solito la conseguenza di una gammopatia policlonale, che però non sembra essere causata da una produzione anticorpale *Ehrlichia*-specifici.^{9,27} Pochi cani soccombono alla malattia acuta; la maggior parte si libera del microrganismo (probabilmente grazie all'immunità cellulomediata) o passa nello stadio subclinico dell'infezione.^{4,9}

Fase subclinica

La fase subclinica dell'infezione da *E. canis* è caratterizzata dalla persistenza del microrganismo nell'ospite in assenza di malattia clinicamente manifesta. Sembra probabile che i batteri vengano conservati in numero limitato negli elementi mononucleari della milza durante l'infezione subclinica.²⁸ La durata di questa fase può variare da settimane ad anni; in realtà, si ignora quale percentuale di cani con infezione subclinica svilupperà mai la malattia. In un singolo studio su cani con infezione naturale, nel 53% dei casi sono stati dimostrati titoli anticorpali positivi per *E. canis* quattro anni dopo il momento presunto dell'infezione, ma questi animali restavano clinicamente asintomatici. Tuttavia, molti di questi cani morirono, presentando alterazioni dell'esame emocromocitometrico completo (ad es., iperglobulinemia, trombocitopenia) indicativi di erlichiosi.²⁹ L'infezione subclinica da *E. canis* è ben documentata, ma è meno chiaro se anche altre specie di *Ehrlichia* inducano infezioni persistenti, ma subcliniche. In almeno un caso,¹² sono state osservate morule di *E. ewingii* in un cane asintomatico.

Stadio cronico

La patogenesi dello stadio cronico dell'infezione da *E. canis* è poco nota perché non sono disponibili modelli adeguati. Non tutti gli animali infetti progrediscono fino a questo stadio ed i fattori che influenzano tale progressione sono ancora sconosciuti. L'infezione persistente da *E. canis* esita nella formazione di anticorpi persistenti (sia aspecifici che diretti verso *Ehrlichia*).^{9,30,31} Sfortunatamente, l'immunità umorale nei confronti di *E. canis* non fornisce alcuna protezione.^{4,32} Anzi, molte delle manifestazioni dell'erlichiosi cronica possono essere dovute ad una risposta immunitaria umorale esuberante, ma non protettiva.^{4,9} Come nello stadio acuto, le tendenze emorragiche possono essere correlate a trombocitopenia o trombocitopenia. Oltre ai meccanismi precedentemente menzionati, l'iperglobulinemia associata ad infezione cronica è spesso più pronunciata e si può avere una sindrome da iperviscosità con conseguente trombocitopenia.²⁶ La deposizione di complessi antigene-anticorpo con conseguente danno infiammatorio può determinare una glomerulonefrite.²³ L'ipoplasia midollare è stata un classico riscontro associato all'infezione cronica da *E. canis* e può esitare in pancitopenia.^{3,22,23} L'anemia non rigenerativa che accompagna comunemente l'infezione cronica da *E. canis* può essere causata da anemia da malattia infiammatoria o pancitopenia da ipoplasia midollare.^{22,23,33} Le malattie infettive concomitanti documentate nei cani con *E. canis* sono state attribuite agli effetti immunosoppressori dell'infezione cronica.²³

RISCONTRI CLINICI

Ehrlichia canis

I riscontri clinici associati all'infezione da *E. canis* variano enormemente e sono probabilmente influenzati dal ceppo di microrganismo, dallo status immunitario dell'ospite e dalla razza dell'animale.^{4,34} I pastori tedeschi sono classicamente considerati più suscettibili all'infezione ed ad un decorso più fulminante rispetto ai cani di altre razze.³⁴⁻³⁶ Per definizione, nella fase subclinica dell'infezione non si riscontra alcun segno clinico apparente, sebbene possano venire identificate delle anomalie ematologiche.²⁹ Spesso, lo stadio acuto dell'infezione passa inosservato oppure i segni clinici sono tanto lievi che i proprietari non si rivolgono ai veterinari per far curare i loro animali. Quando i cani vengono valutati durante lo stadio acuto dell'infezione, i segni clinici sono in gran parte aspecifici e rappresentati da letargia, febbre, anoressia, perdita di peso, splenomegalia e linfadenopatia generalizzata.^{4,37}

La maggior parte delle diagnosi di infezione da *E. canis* viene formulata durante lo stadio cronico. Come avviene per gli animali portati alla visita nello stadio acuto, i proprietari dei cani con erlichiosi cronica in genere riferiscono manifestazioni aspecifiche, quali letargia, anoressia e perdita di peso.^{23,34} Nel 25-60% dei casi si riscontrano segni attribuibili a tendenze emorragiche, quali epistassi, melena, emorragie petecchiali e/o ecchimotiche, ifema, emorragie retiniche ed ematuria.^{22,23,33,34} Altri riscontri rilevabili all'esame clinico sono rappresentati da linfadenopatia, febbre, pallore delle mucose e splenomegalia.^{22,23,33,34}

Occasionalmente si notano uveite anteriore, alterazioni retiniche o anomalie neurologiche.^{23,38} Come manifestazioni neurologiche dell'infezione sono state segnalate atassia, paraparesi, deficit della propriocezione conscia, testa piegata, nistagmo e crisi convulsive.²³ L'importanza della zoppia come segno clinico dell'infezione da *E. canis* è discutibile. Anche se spesso viene elencata nella vecchia letteratura come manifestazione classica dell'infezione, molti degli animali che mostrano zoppia sono risultati colpiti da morule granulocitarie, il che suggerisce che l'infezione possa essere stata causata da *E. ewingii* piuttosto che da *E. canis*.³⁹⁻⁴¹ Altri segni clinici dell'infezione cronica da *E. canis* sono correlati a complicazioni quali glomerulonefrite con sindrome nefrosica o pancitopenia con conseguenti infezioni secondarie e grave anemia.

Anche le anomalie degli esami di laboratorio sono aspecifiche. Benché il riscontro di concentrazioni piastriniche normali non permetta di escludere l'erlichiosi cronica, nella maggior parte dei casi si osserva un certo grado di trombocitopenia.^{22,23,33,34} In genere, viene identificata anche un'anemia non rigenerativa (spesso lieve o moderata). Il conteggio dei leucociti nei cani con erlichiosi può risultare al di sotto, entro o al di sopra dei limiti di riferimento.^{22,23,33} Benché non sia stata segnalata costantemente, nella maggior parte dei casi è stata osservata l'iperglobulinemia.^{22,33,34} Benché di solito dovuta a gammopatia policlonale, quest'ultima condizione si può presentare sotto forma di gammopatia monoclonale, che può essere facilmente confusa con un mieloma multiplo.^{27,42} Altre anomalie del profilo biochimico notate con una certa regolarità sono l'ipoalbuminemia e la presenza di elevati livelli di fosfatasi alcalina e di alanina-transaminasi.^{22,23,33} La proteinuria si può riscontrare indipendentemente o in concomitanza con la glomerulonefrite.^{22,23,33,43,44} Anche se le descrizioni iniziali dell'infezione da *E. canis* riferivano di una pancitopenia tropicale, le manifestazioni pancitopeniche sembrano oggi costituire solo una piccola minoranza di casi negli Stati Uniti. La valutazione citologica degli aspirati midollari spesso evidenzia un incremento numerico di plasmacellule, con ipoplasia (che suggerisce un'infezione cronica) o iperplasia (che suggerisce un'infezione acuta o cronica) degli altri elementi midollari.^{3,22,23,37}

Ehrlichia ewingii

E. ewingii è, insieme ad *E. equi*, una delle due erlichie note per determinare un'infezione granulocitaria nel cane.¹² Sfortunatamente, l'identificazione delle morule granulocitarie non consente di differenziare l'infezione da *E. equi* da quella da *E. ewingii*, che probabilmente predomina negli Stati Uniti meridionali e nella zona più meridionale del midwest. Poiché *E. ewingii* appartiene allo stesso genogruppo di *E. canis*, durante l'infezione i titoli di quest'ultima risultano positivi.¹² Molte descrizioni di infezioni granulocitarie da *Ehrlichia* sono relative a cani con poliartrite ad insorgenza acuta e questi casi sono stati molto spesso attribuiti all'infezione da *E. ewingii*.^{5,39-41,45} La zoppia può interessare più di un arto o sembrare spostarsi da un'estremità all'altra. Si possono notare rigidità ed occasionale tumefazione articolare dovuta al versamento ed i

cani sono spesso febbrili. Sono state descritte splenomegalia ed epatomegalia. È possibile osservare delle tendenze alle emorragie e molti cani infetti presentano una trombocitopenia lieve o moderata.¹² È stato segnalato un coinvolgimento del sistema nervoso centrale, rappresentato in particolare da una meningite.⁴⁶ Sono state anche descritte infezioni dupplici da *E. canis* ed *E. ewingii* in associazione, con profonda atassia ed epistassi.⁴⁷ La poliartrite si risolve rapidamente con una terapia appropriata. Le infezioni granulocitarie da *Ehrlichia* ad esito fatale sembrano essere estremamente rare nel cane.

Ehrlichia equi

Come nel caso di *E. ewingii*, l'autentica incidenza dell'infezione da *E. equi* nel cane è sconosciuta, ma questo microrganismo può sostenere una percentuale significativa dell'erlichiosi granulocitaria negli Stati Uniti nord orientali e nella zona settentrionale del midwest e nella California, dove le infezioni equine sono endemiche.^{7,11,12} L'infezione sperimentale da *E. equi* nel cane determina solo la comparsa di segni clinici lievi o inapparenti, ma cani con infezione naturale sono stati portati alla visita con manifestazioni di malattia aspecifica, quali febbre, letargia o trombocitopenia.^{11,48} Non esistono riscontri clinici esclusivi attribuibili all'infezione da *E. equi*, ma la poliartrite viene descritta meno frequentemente che per *E. ewingii*.¹¹ Senza un sospetto, è possibile che i veterinari non richiedano l'esecuzione di test diagnostici specifici necessari per differenziare questa infezione da erlichie dalle altre ed i titoli per *E. canis* possono essere negativi.^{11,12}

Ehrlichia risticii

E. risticii, l'agente eziologico della *Potomac horse fever*, può infettare cani e gatti oltre che i cavalli. Questo agente si trasmette non attraverso il morso di una zecca, ma piuttosto per ingestione di chioccioline, il che forse spiega perché l'infezione nel cane non venga descritta comunemente. Nei cani colpiti, sono stati segnalati letargia, vomito, disordini emorragici ed artralgia.¹³ Poiché *E. risticii* appartiene ad un genogruppo differente da *E. canis*, la reattività anticorpale crociata può mancare. A meno che non vengano richiesti titoli specifici per il genogruppo, i cani con infezione da *E. risticii* possono risultare sieronegativi.¹³

Ehrlichia chaffeensis

Sebbene *E. chaffeensis* sia importante principalmente come agente patogeno dell'uomo, anche i cani sono suscettibili all'infezione sostenuta da questo microrganismo. Quelli con infezione sperimentalmente indotta sembrano manifestare una malattia lieve o inapparente.⁴⁹ Tuttavia, in una segnalazione relativa a tre cani con infezione naturale da *E. chaffeensis* sono state documentate manifestazioni più gravi, quali vomito, epistassi, linfadenopatia ed uveite anteriore.⁶ Poiché *E. chaffeensis* appartiene allo stesso genogruppo di *E. canis*, nei cani colpiti i titoli anticorpali di routine devono risultare positivi.⁶

Ehrlichia platys

E. platys presenta caratteristiche esclusive fra le specie di *Ehrlichia*, per la sua predisposizione a colpire le piastrine piuttosto che i leucociti. Il microrganismo non condivide la reattività sierologica con *E. canis*, ma sono state documentate delle coinfezioni.^{8,15,50,51}

Anche se esita in una trombocitopenia ciclica, l'infezione da *E. platys* nel cane è raramente la causa di sanguinamenti clinicamente manifesti, a meno che non si verifichino traumi o interventi chirurgici durante il ciclo trombocitopenico.^{52,53} Le manifestazioni di malattia associate ad *E. platys* possono essere molto più gravi nei ceppi riscontrati al di fuori degli Stati Uniti.^{54,56} I veterinari devono prendere in considerazione il ricorso a test specifici per l'identificazione dell'infezione sostenuta da questo microrganismo nei cani con segni ricorrenti di trombocitopenia in cui non è possibile documentare alcuna altra causa (comprese le infezioni da erlichie più comuni).

Erlichiosi felina

L'erlichiosi felina va trattata separatamente da quella canina.⁵⁷ I gatti sono stati sperimentalmente infettati sia con *E. risticii* che con *E. equi*, ottenendo infezioni subcliniche o lievi forme di malattia.^{48,58} Sino ad oggi, non sono state tentate infezioni sperimentali da *E. canis* o *E. ewingii*. L'erlichiosi felina ad insorgenza spontanea è stata documentata soltanto in 31 gatti in tutto il mondo. Questi animali presentavano vari segni clinici quali febbre, anoressia, artropatia, manifestazioni gastroenteriche e malessere generalizzato.^{57,59-62} Sino a che non verrà messo a punto un quadro più chiaro dell'importanza e della presentazione clinica dell'erlichiosi felina, questa dovrà restare una condizione da prendere in considerazione nei gatti che mostrano vari quadri clinici inspiegabili. La diagnosi si fonda sull'esclusione di altre cause delle manifestazioni patologiche descritte, associata all'identificazione delle morule all'interno delle cellule del sangue periferico o alla dimostrazione sierologica dell'esposizione ad una *Ehrlichia* spp., nonché alla risoluzione dei segni clinici dopo un'appropriata terapia antibiotica.⁵⁷ Sono state descritte infezioni sia granulocitarie che monocitarie, con le previste variazioni della reattività sierologica nei confronti dei differenti agenti erlichiali.^{57,60,62}

DIAGNOSI

L'erlichiosi viene di solito diagnosticata sulla base dei segni clinici, della presenza di anomalie di laboratorio compatibili e dei risultati dei test specifici per *Ehrlichia*. Anche se l'osservazione delle morule intracellulari ha valore diagnostico, nella maggior parte dei casi la ricerca di queste formazioni risulta insoddisfacente.³⁵ L'impiego di tecniche di concentrazione, come l'esame del *buffy-coat* con una colorazione di tipo Romanovsky, consente di aumentare al massimo le probabilità di identificazione delle morule.³ Queste ultime si possono osservare nei leucociti del sangue periferico o di altri fluidi, compresi quello cefalorachidiano e quello articolare.^{39,40,46,47} In generale, le mo-



FIGURA 1 - Nel citoplasma di un neutrofilo, si osserva una morula basofila e tondeggianti di *E. ewingii*. (Per cortese concessione di Steve Stockham, DVM, MS, Kansas State University.)

rule si osservano più facilmente durante la fase acuta dell'infezione monocitaria da *E. canis* o durante l'infezione sostenuta dalle specie granulocitarie *E. ewingii* ed *E. equi* (Fig. 1).^{5,11,23,35}

Il test diagnostico più comunemente impiegato in caso di sospetta infezione da *Ehrlichia* è l'immunofluorescenza indiretta (IFA). Questa forma di esame non rileva l'effettiva presenza dei microrganismi appartenenti a questo genere, ma piuttosto quella degli anticorpi specifici per le erlichie nel siero. I veterinari che ricorrono all'IFA devono essere consapevoli del fatto che il riscontro del titolo positivo in un cane proveniente da un'area endemica non conferma che la malattia in esame sia causata da un'infezione da *Ehrlichia*. Piuttosto, la positività del titolo conferma l'esposizione a microrganismi, ma si può osservare anche dopo che l'animale è venuto a contatto con esso ma se ne è liberato, durante lo stadio subclinico o in seguito ad un trattamento di successo, oltre che durante un'infezione in atto. Analogamente, un titolo negativo non esclude l'infezione. Gli animali moribondi possono cessare di produrre anticorpi, con conseguente diminuzione o negativizzazione del titolo ed i cani con infezione acuta necessitano di 7-21 giorni per la sieroconversione, per cui sono possibili titoli negativi in cani infetti.⁶³ A seconda del particolare test di immunofluorescenza utilizzato, l'indagine sierologica può essere più o meno specifica per una data specie di *Ehrlichia*. Gli anticorpi formati nei confronti di una di tali specie possono dare origine a reazioni crociate con altre. Quelle che rientrano nello stesso genogruppo hanno buone probabilità di presentare una reattività sierologica crociata. Analogamente, i titoli nei confronti di un genogruppo possono risultare negativi in caso di infezione sostenuta da membri di un genogruppo differente (ad es., i titoli di *E. canis* possono essere negativi durante l'infezione da *E. equi*). Attualmente, in commercio si trovano test per la titolazione specifica per i membri di ciascun genogruppo, quali *E. canis*, *E. equi*, *E. risticii* ed *E. platys*.^a

La reazione a catena della polimerasi (PCR) rileva la presenza del DNA derivante dalle erlichie. I *primer* vengono scelti in modo da amplificare una porzione del DNA batterico, consentendo di individuare questo materiale genetico.

^a ProtaTek International, Inc., Chandler, AZ.

L'uso di *primer* generici per *Ehrlichia* consente di rilevare una qualunque delle parecchie specie di batteri appartenenti a questo genere utilizzando un unico test. In alternativa, servendosi di *primer* dedicati ad una porzione specifica ed altamente variabile del gene batterico, la PCR può identificare le specifiche specie di *Ehrlichia* in un animale colpito. Attualmente, sono disponibili *primer* di questo genere per *E. canis*, *E. ewingii*, *E. equi*, *E. chaffeensis*, *E. risticii* ed *E. platys*.⁶ Molti laboratori del commercio si servono di *primer* generici per poi effettuare o meno la specificazione dei campioni positivi.^{b,c} Anche se la PCR può essere un test sensibile, la scelta del campione influenza i risultati. La maggior parte dei laboratori commerciali che eseguono questo esame richiede campioni di sangue intero, ma i microrganismi possono talvolta venire sequestrati in numero limitato in tessuti come la milza o il midollo osseo.⁶⁴ Occasionalmente, la PCR può essere utilizzata in associazione con l'IFA per differenziare l'esposizione ad *Ehrlichia* dall'autentica infezione (ad esempio, una volta portato a termine un trattamento ed in presenza di segni clinici che perdurano e di titoli erlichiali persistenti).⁶⁵ Per ottenere risultati affidabili con la tecnica PCR è di importanza cruciale il controllo di qualità del laboratorio.

È stato immesso sul mercato un kit commerciale per lo screening ambulatoriale degli anticorpi anti-*B. burgdorferi*.^d I test ELISA di screening di questo genere sono stati studiati per determinare una risposta positiva in animali con un titolo anticorpale corrispondente ad una titolazione IFA superiore a 1:500. Secondo quanto segnalato in letteratura, la sensibilità e la specificità di questi kit sono, rispettivamente, pari al 98,9% ed oltre il 99%. Come per qualsiasi test, il valore predittivo è più importante della sensibilità o specificità, ma dipende da entrambe, oltre che dalla prevalenza della malattia in questione. Quindi, la positività di un test di screening in un'area endemica ha maggiori probabilità di riflettere un'autentica possibilità di quante non ne abbia lo stesso risultato in un'area con una minore prevalenza della malattia. Come per il test IFA, il riscontro di un titolo positivo va interpretato con cautela, perché può rappresentare un'infezione in atto o già risolta o semplicemente un'esposizione.

TRATTAMENTO

Le tetracicline sono state per anni il trattamento d'elezione delle infezioni da *Ehrlichia*.³ L'assorbimento e la possibilità di effettuare somministrazioni ad intervalli poco frequenti fanno della doxiciclina il farmaco preferito.^{32,66} Anche se in passato è stato raccomandato un ciclo di 7-14 giorni di doxiciclina alla dose di 10 mg/kg/die,^{4,6,32} è possibile che una simile durata del trattamento sia inadeguata.^{66,67} In effetti, in uno studio su cani con infezione subclinica trattati con doxiciclina per 6 settimane, era ancora possibile identificare mediante PCR dei microrganismi del genere *Ehrlichia* in un cane su quattro.⁶⁷ Anche se la durata appropriata del trattamento non è stata determinata, la

terapia nei cani con infezione cronica può essere lunghissima ed i titoli possono restare elevati per mesi o anni, indipendentemente dalla durata della terapia. Cicli terapeutici ancora più lunghi (in media, 210 giorni) non hanno determinato la comparsa di titoli negativi in una percentuale significativa di cani con infezione spontanea.³⁰ Anche se la maggior parte degli studi è stata diretta alle infezioni da *E. canis*, la doxiciclina si è dimostrata efficace anche per quelle da *E. equi* ed *E. ewingii*, ma meno efficace per *E. chaffeensis*.^{6,12,32}

Anche l'imidocarb dipropionato, disponibile solo da poco negli Stati Uniti, è stato utilizzato con successo per il trattamento dell'erlichiosi canina. Benché uno studio del 1980 abbia riscontrato che questo farmaco determina una *clearance* più efficace di *E. canis* di quanto non faccia un ciclo di tetracicline di due settimane, recenti studi condotti utilizzando la doxiciclina non hanno documentato alcuna differenza nella risposta clinica dei cani trattati con l'uno o l'altro farmaco da soli o con entrambi simultaneamente.^{68,69} L'imidocarb si impiega alla dose di 5 mg/kg IM praticando una seconda iniezione a due settimane di distanza dalla prima.^{4,69} Il pretrattamento con atropina può diminuire l'occorrenza di effetti collaterali anticolinergici sgradevoli, quali salivazione, scolo nasale sieroso, diarrea e dispnea.

Per il trattamento delle infezioni da *Ehrlichia* sono stati valutati anche altri agenti antibatterici. Nei cuccioli, si può utilizzare il cloramfenicolo per evitare l'alterazione cromatica dei denti in eruzione associata alla tetraciclina.⁴ Attualmente, non è possibile raccomandare i chinoloni per il trattamento dell'erlichiosi. Benché sia stato utilizzato con successo per il trattamento sperimentale dell'infezione da *Rickettsia rickettsii* nel cane, l'enrofloxacin non sembra rappresentare una terapia efficace per *E. canis*. La maggior parte dei cani con infezioni sperimentali da *E. canis* trattati con dosi da 10 mg/kg per os ogni 12 ore per 21 giorni è rimasta trombocitopenica e positiva alle emocolture.³² Analogamente, il ciprofloxacina non ha avuto successo per eliminare le infezioni da *E. chaffeensis* nell'uomo.⁷⁰

Oltre agli antibiotici, durante le infezioni da erlichie possono essere necessarie altre terapie di sostegno. I glucocorticosteroidi possono attenuare la distruzione immunomediata delle piastrine associata all'infezione e quindi, in presenza di una trombocitopenia grave o in attesa dei test diagnostici finalizzati a differenziare l'erlichiosi dalla trombocitopenia immunomediata può essere indicato un breve (2-7 giorni) ciclo di prednisone.^{4,23} Possono servire anche gli steroidi, per il trattamento della poliartrite, della vasculite o della meningite associata a certi tipi di infezione da *Ehrlichia*.^{4,46,47} Altri trattamenti di sostegno possono essere rappresentati dalla somministrazione di fluidi cristalloidi o colloidi per via parenterale o dalle trasfusioni di sangue, a seconda delle necessità.^{3,4} Analogamente, le complicazioni dell'infezione cronica da *E. canis* (ad es., glomerulonefrite, pancitopenia) possono richiedere uno specifico supporto terapeutico.

VALUTAZIONE DEL TRATTAMENTO

La valutazione del trattamento resta problematica. Nei casi acuti e, spesso, anche in quelli cronici lievi entro alcuni giorni dall'inizio di una terapia appropriata di solito si

^b Antech Diagnostics, Irvine, CA.

^c Tick-borne disease testing facility, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC.

^d Snap® 3Dx Test, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME.

possono notare la risoluzione dei segni clinici e la normalizzazione dei conteggi piastrinici.^{4,23,69} Anche dopo il rapido miglioramento clinico, gli studi condotti hanno rilevato che una volta portata a termine la terapia con doxiciclina è possibile che i conteggi piastrinici diminuiscano nuovamente, i titoli restino elevati, i microrganismi si possano ancora isolare in coltura e la PCR rimanga positiva.^{64,69} I titoli anticorpali sierici possono restare elevati per mesi o anni dopo un trattamento appropriato in cani che per il resto si presentano clinicamente ed ematologicamente normali.^{30,31,64,69} Questi titoli persistentemente positivi, che tendono ad essere correlati con quelli iniziali più elevati, possono indicare il perdurare dell'infezione o una reinfezione, oppure essere indicativi soltanto di un'infezione pregressa.^{23,30} La PCR può rappresentare la miglior opportunità per documentare la *clearance* del microrganismo dopo la terapia, ma anche questa valutazione può essere problematica. Questa metodica rileva il DNA batterico, ma non può distinguere fra i microrganismi viventi e quelli che non lo sono più. Tuttavia, è improbabile che erlichie morte persistano nell'organismo per più di alcune settimane, il che rende un esito positivo della PCR fortemente indicativo di infezione in atto. Il maggior problema è correlato ai risultati falsi negativi, quando si effettua il campionamento di tessuti che contengono bassi livelli di microrganismi (ad es., sangue, midollo osseo).^{64,65} Parlando in termini pratici, i cani trattati in cui i riscontri clinici e di laboratorio indicano la risoluzione della malattia, non devono essere ulteriormente sottoposti a valutazioni per la ricerca dei microrganismi. Nei soggetti trattati in modo appropriato per l'infezione, ma in cui restano segni di malattia, la positività della PCR impone la prosecuzione o la modificazione del trattamento, mentre la sua negatività deve far prendere in considerazione la possibilità che la malattia osservata non fosse dovuta all'erlichiosi.

PREVENZIONE E CONTROLLO

Sfortunatamente, l'esposizione ad *E. canis* non conferisce un'immunità protettiva. La misura preventiva più importante per evitare le infezioni o le reinfezioni è il controllo efficace delle zecche. Attualmente, sono disponibili diversi prodotti molto validi da applicare direttamente sui cani, quali Frontline® Top Spot™ (Merial Ltd, Iselin, NJ), collari Preventic® (Virbac, Inc., Fort Worth, TX) e Kiltix® Topical Tick Control for dogs (Bayer Animal Health, Shawnee Mission, KS). Inoltre, esistono molti spray da impiegare nelle strutture per diminuire la popolazione delle zecche negli ambienti frequentati dagli animali. Per la prevenzione dell'infezione è stato anche suggerito l'impiego a scopo profilattico di tetracicline durante la stagione delle zecche, ma questa opzione non è esente dai costi o dai rischi associati all'impiego degli antibiotici.⁴ Per evitare la malattia che accompagna l'infezione cronica da *E. canis* è stato suggerito di effettuare il monitoraggio sierologico dei soggetti che vivono nelle aree endemiche e trattare gli animali positivi indipendentemente dalla presenza di segni clinici.⁴ Gli autori suggeriscono di considerare la positività al test di screening (ad es., ELISA) come una prova della necessità di un'ulteriore valutazione. Come minimo, quest'ultima dovrà comprendere un approfondito esame clini-

co, il conteggio piastrinico quantitativo e la misurazione dei livelli sierici di globuline. La positività dei test di screening può anche suggerire il ricorso a prove di conferma, come la IFA o la PCR, prima di dare inizio ad una terapia antibiotica.

POTENZIALE ZONOSICO

Dopo la prima descrizione di erlichiosi monocitaria umana (HME) negli Stati Uniti nel 1986,⁷¹ la malattia ha ottenuto l'interesse del mondo scientifico e del pubblico. All'agente eziologico della HME, che presenta una propensione all'infezione degli elementi monocitari ed induce la produzione degli anticorpi che danno origine ad una reattività crociata con *E. canis* è stato dato il nome di *E. chaffeensis*.⁷² L'infezione sostenuta da questo microrganismo è stata identificata nel cane sia in ambito sperimentale che naturale, con una persistenza delle erlichie della durata di mesi.^{6,49} Queste infezioni durature giustificano la preoccupazione che i cani possano fungere da serbatoio di infezione per la malattia nell'uomo.⁷² Inoltre, sembra che la doxiciclina non sia in grado di eliminare facilmente il microrganismo dai cani con infezione spontanea.⁶ Oltre alla HME, è stata riconosciuta anche la HGE. L'agente eziologico di quest'ultima, che differisce da quello della HME, si è dimostrato quasi identico ad *E. phagocytophila* ed *E. equi*. Benché questi microrganismi siano più comunemente associati all'infezione, rispettivamente, dei piccoli ruminanti e/o dei cavalli, entrambi sono stati isolati dal cane, giustificando anche in questo caso la possibilità che questa specie animale possa fungere da serbatoio per l'infezione umana.^{8,11,73,74} Inoltre, i comuni agenti dell'erlichiosi canina, *E. canis* ed *E. ewingii*, possono occasionalmente causare una malattia clinicamente manifesta nell'uomo.⁷⁵ I segni clinici della HME e della HGE sono molto simili e rappresentati da febbre, mal di testa e mialgia. Se lasciate senza alcun trattamento, entrambe le infezioni possono risultare fatali per l'uomo.^{8,71,72,76}

CONCLUSIONE

L'erlichiosi è un'infezione batterica trasmessa in gran parte attraverso il morso di zecche infette. Non è più possibile ritenere a priori che i cani con erlichiosi siano colpiti soltanto da un'infezione da *E. canis*. I veterinari devono conoscere le analogie e le differenze che esistono fra questo microrganismo ed altre infezioni trasmesse da artropodi. Nei cani con segni clinici ed anomalie di laboratorio che suggeriscono la presenza di questa patologia è possibile iniziare una terapia con doxiciclina in attesa dei risultati degli specifici test diagnostici. I veterinari che esercitano la professione nelle aree endemiche si trovano di fronte al compito, spesso difficile, di distinguere l'infezione da *Ehrlichia* dalla semplice esposizione. Una volta formulata la diagnosi, il trattamento deve continuare per almeno tre settimane. Durante la stagione delle zecche, nelle aree endemiche è necessario adottare gli specifici provvedimenti antiparassitari non solo per evitare la malattia, ma anche per ridurre il rischio che i cani diventino portatori della stessa per i loro compagni umani.

Bibliografia

- Donatien A, Lestoquard F: Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bull Soc Pathol Exot* 28:418-419, 1935.
- Keefe TJ, Holland CJ, Salyer PE, Ristic M: Distribution of Ehrlichia canis among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *JAVMA* 181:236-238, 1982.
- Huxsoll DL, Hildebrandt PK, Nims RM, Walker JS: Tropical canine pancytopenia. *JAVMA* 157:1627-1632, 1970.
- Neer TM: Ehrlichiosis: Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis, in Greene GE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, ed 2. Philadelphia, WB Saunders Co, 1998, pp 139-149.
- Stockham SL, Schmidt DA, Curtis KS, et al: Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi. *Am J Vet Res* 53:63-68, 1992.
- Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI: Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii. *J Clin Microbiol* 36:2645-2651, 1998.
- Magnarelli LA, Ljdo JW, Anderson JF, et al: Antibodies to Ehrlichia equi in dogs from the northeastern United States. *JAVMA* 211:1134-1137, 1997.
- Dumler JS, Bakken JS: Ehrlichial diseases of humans: Emerging tick-borne infections. *Clin Infect Dis* 20:1102-1110, 1995.
- Harrus S, Waner T, Bark H, et al: Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 37:2745-2749, 1999.
- Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, et al: A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 79:325-339, 1998.
- Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS: Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 34:44-48, 1996.
- Goldman EE, Breitschwerdt EB, Grindem CB, et al: Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 12:61-70, 1998.
- Kakoma I, Hansen RD, Anderson BE, et al: Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 32:170-175, 1994.
- Pretzman C, Ralph D, Stothard DR, et al: 16S rRNA gene sequence of Neorickettsia helminthoeca and its phylogenetic alignment with members of the genus Ehrlichia. *Int J Syst Bacteriol* 45:207-211, 1995.
- Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, et al: Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* 37:2631-2638, 1999.
- Matthewman LA, Kelly PJ, Bobade PA, et al: Infections with Babesia canis and Ehrlichia canis in dogs in Zimbabwe. *Vet Rec* 133:344-346, 1993.
- du Plessis JL, Fourie N, Nel PW, Evezard DN: Concurrent babesiosis and ehrlichiosis in the dog: Blood smear examination supplemented by the indirect fluorescent antibody test, using Cowdria ruminantium as antigen. *Onderstepoort J Vet Res* 57:151-155, 1990.
- Magnarelli LA, Anderson JF: Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in northeastern United States. *J Clin Microbiol* 31:2857-2860, 1993.
- Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, et al: Ixodes dammini as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 172:1007-1012, 1995.
- Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM: Immunoserologic evidence of coinfection with Borrelia burgdorferi, Babesia microti, and human granulocytic Ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol* 34:724-727, 1996.
- Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS, et al: Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila, and human granulocytic Ehrlichia. *J Clin Microbiol* 33:1098-1103, 1995.
- Waddle JR, Littman MP: A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *JAAHA* 24:615-620, 1988.
- Frank JR, Breitschwerdt EB: A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 13:194-201, 1999.
- Warner T, Harrus S, Weiss DJ, et al: Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 48:177-182, 1995.
- Grindem CB, Breitschwerdt EB, Perkins PC, et al: Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *JAAHA* 35:56-61, 1999.
- Harrus S, Waner T, Eldor A, et al: Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Rec* 139:290-293, 1996.
- Harrus S, Waner T, Avidar Y, et al: Serum protein alteration in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 66:241-249, 1996.
- Harrus S, Waner T, Keysary A, et al: Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 62:15-27, 1998.
- Codner EC, Farris-Smith LL: Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *JAVMA* 189:47-50, 1986.
- Bartsch RC, Greene RT: Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: Follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *J Vet Intern Med* 10:271-274, 1996.
- Perille AL, Matus RE: Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *J Vet Intern Med* 5:195-198, 1991.
- Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI: Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42:362-368, 1998.
- Troy GC, Vulgamott JC, Turnwald GH: Canine ehrlichiosis: A retrospective study of 30 naturally occurring cases. *JAAHA* 16:181-187, 1980.
- Harrus S, Kass PH, Klement E, Waner T: Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec* 141:360-363, 1997.
- Elias E: Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of E. canis. *J Small Anim Pract* 33:540-543, 1991.
- Nyindo M, Huxsoll DL, Ristic M, et al: Cell-mediated and humoral immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with Ehrlichia canis. *Am J Vet Res* 41:250-254, 1980.
- Buhles Jr WC, Huxsoll DL, Ristic M: Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to Ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *J Infect Dis* 130:357-367, 1974.
- Panciera RJ, Ewing SA, Confer AW: Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. *Vet Pathol* 38:43-46, 2001.
- Cowell RL, Tyler RD, Clinkenbeard KD, Meinkoth JH: Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. *JAVMA* 192:1093-1095, 1988.
- Bellah JR, Shull RM, Selcer EV: Ehrlichia canis-related polyarthritis in a dog. *JAVMA* 189:922-923, 1986.
- Stockham SL, Schmidt DA, Tyler JW: Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from central Missouri, a possible cause of polyarthritis. *Vet Med Rev* 6:63-65, 1985.
- Breitschwerdt EB, Woody BJ, Zerbe CA, et al: Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *J Vet Intern Med* 1:2-9, 1987.
- Codner EC, Maslin WR: Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. *Am J Vet Res* 53:294-299, 1992.
- Varela F, Font X, Valladares JE, Alberola J: Thrombocytopathia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with Ehrlichia canis. *J Vet Intern Med* 11:309-311, 1997.
- Anderson BE, Greene CE, Jones DC, Dawson JE: Ehrlichia ewingii sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *Int J Syst Bacteriol* 42:299-302, 1992.
- Maretzki CH, Fisher DJ, Greene CE: Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *JAVMA* 205:1554-1556, 1994.
- Meinkoth JH, Ewing SA, Cowell RL, et al: Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. *J Vet Intern Med* 12:389-393, 1998.
- Lewis GE, Huxsoll DL, Ristic M, Johnson AJ: Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with Ehrlichia equi, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am J Vet Res* 36:85-88, 1975.
- Dawson JE, Ewing SA: Susceptibility of dogs to infection with Ehrlichia chaffeensis causative agent of human ehrlichiosis. *Am J Vet Res* 53:1322-1327, 1992.
- Suksawat J, Pitulle C, Arraga-Alvarado C, et al: Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *J Clin Microbiol* 39:90-93, 2001.
- Hua P, Yuhai M, Shide T, et al: Canine ehrlichiosis caused simultaneously by Ehrlichia canis and Ehrlichia platys. *Microbiol Immunol* 44:737-739, 2000.
- Mathew JS, Ewing SA, Murphy GL, et al: Characterization of a new isolate of Ehrlichia platys (Order Rickettsiales) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 68:1-10, 1997.
- Bradfield JF, Vore SJ, Pryor Jr WH: Ehrlichia platys infection in dogs. *Lab Anim Sci* 46:565-568, 1996.
- Harrus S, Aroch I, Lavy E, Bark H: Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec* 141:247-250, 1997.
- Kontos VI, Papadopoulos O, French TW: Natural and experimental canine infections with a Greek strain of Ehrlichia platys. *Vet Clin Pathol* 20:101-105, 1991.
- Sainz A, Amusatogui I, Tesouro MA: Ehrlichia platys infection and disease in dogs in Spain. *J Vet Diag Invest* 11:382-384, 1999.

57. Stubbs CJ, Holland CJ, Relf JS, et al: Feline ehrlichiosis. *Compend Contin Educ Pract Vet* 22(4):307-318, 2000.
58. Dawson JE, Abeygunawardena I, Holland CJ, et al: Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis. *Am J Vet Res* 49:2096-2100, 1988.
59. Peavy GM, Holland CJ, Dutta SK, et al: Suspected ehrlichial infection in five cats from a household. *JAVMA* 210:231-234, 1997.
60. Buoro IB, Atwell RB, Kiptoon JC, Ihiga MA: Feline anaemia associated with *Ehrlichia*-like bodies in three domestic shorthaired cats. *Vet Rec* 125:434-436, 1989.
61. Bouloy RP, Lappin MR, Holland CH, et al: Clinical ehrlichiosis in a cat. *JAVMA* 204:1475-1478, 1994.
62. Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF: Feline granulocytic ehrlichiosis—A report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. *J Small Anim Pract* 40:20-24, 1999.
63. Weisiger RM, Ristic M, Huxsoll DL: Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *Am J Vet Res* 36:689-694, 1975.
64. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, et al: Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 36:73-76, 1998.
65. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, et al: Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol* 35:1852-1855, 1997.
66. Iqbal Z, Rikihisa Y: Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *J Clin Microbiol* 32:1644-1649, 1994.
67. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Bark H: Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol* 36:2140-2142, 1998.
68. Price JE, Dolan TT: A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. *Vet Rec* 107:275-277, 1980.
69. Sainz A, Tesouro MA, Amusatogui I, et al: Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. *J Vet Intern Med* 14:134-139, 2000.
70. Brouqui P, Raoult D: In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans, *Ehrlichia chafeensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:2799-2803, 1992.
71. Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, et al: Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med* 316:853-856, 1987.
72. Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, et al: Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 29:2741-2745, 1991.
73. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH: Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 32:589-595, 1994.
74. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, et al: Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. A new species emerging? *JAMA* 272:212-218, 1994.
75. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, et al: *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med* 341:148-155, 1999.
76. Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, et al: Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 275:199-205, 1996.