

Nota Técnica

Estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp. en muestras sanguíneas humanas colectadas durante el periodo 2015-2017 en el estado Aragua, Venezuela

Carmen Gregoria Pérez^{1*}, Henry José Fuentes Fuentes¹, Emir Alexi Espinoza Paredes², Wilisberth Yasmirbeth Garcés Hernández¹, Mayra Mercedes Molina González¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), núcleo de Sanidad Animal. Maracay, Venezuela. ²Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Venezuela. *Correo electrónico: carmen980perez@gmail.com

RESUMEN

La ehrlichiosis monocítica humana es una enfermedad zoonótica emergente cuya severidad varía desde una simple infección asintomática hasta una enfermedad severa, con desenlaces fatales en pacientes humano o animal. Este trabajo tuvo como objetivo reportar la presencia de estructuras citoplasmáticas en monocitos, compatibles con *Ehrlichia* sp., en muestras sanguíneas humanas colectadas en diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela, durante el periodo 2015-2017. Ingresaron 613 muestras sanguíneas por sospecha de ehrlichiosis para ser evaluadas mediante frotis de capa blanca. Se aplicó una encuesta epidemiológica a los datos recopilados en los protocolos de recepción de las 613 muestras. Del total de muestras ingresadas, se identificaron estructuras citoplasmáticas en monocitos compatibles con mórulas de *Ehrlichia* sp., en 137 (22,3 %) muestras. Las muestras positivas fueron clasificadas por género, grupo etario y procedencia. Se realizó un análisis descriptivo de los casos de acuerdo a la edad, sexo, municipio y mes de presentación. El grupo de edad 0 - 4 años presentó el mayor número de casos positivos, seguido del grupo de 5 - 9 años. El municipio Girardot mostró el mayor porcentaje de individuos positivos a *Ehrlichia* sp, mientras que el género femenino exhibió el mayor número de casos positivos. Durante todo el año se presentaron casos positivos, aunque con mayor frecuencia en el lapso abril-septiembre. Los hallazgos confirman el riesgo de exposición al agente etiológico por parte de la población vulnerable de los diferentes municipios, y se infiere una aparente debilidad de los programas de educación sanitaria en el estado Aragua.

Palabras clave: rickettsiales, monocitos, enfermedades transmitidas por garrapatas, zoonosis.

Cytoplasmic structures compatible with *Ehrlichia* sp. in human blood samples collected during the period 2015-2017 in Aragua state, Venezuela

ABSTRACT

Human monocytic ehrlichiosis is an emerging zoonotic disease whose severity ranges from a simple asymptomatic infection to a severe disease, with fatal outcomes in human or animal patients. This work aimed to report the presence of cytoplasmic structures in monocytes, compatible with *Ehrlichia* sp., in human blood samples collected in different municipalities of the Aragua state, Venezuela, during the period 2015-2017. Blood samples (613) were admitted for suspected ehrlichiosis and were evaluated by buffy coat smears. An epidemiological survey was applied to the data collected in the reception protocols of the 613 samples. Of the total samples admitted, 137 (22.3 %) samples with cytoplasmic structures in the monocytes, compatible with *Ehrlichia* sp. morulae, were identified. The positive samples were classified by gender, age group and origin. A descriptive analysis of the cases was carried out according to age, sex, municipality and month of presentation. The age group 0 - 4 years old presented the highest number of positive cases, followed by the group 5 - 9 years old. The Girardot municipality showed the highest percentage of individuals positive to *Ehrlichia* sp, while the female gender exhibited the highest number of positive cases. Throughout the year there were positive cases, although more frequently in the April-September period. The findings confirm the risk of exposure to the etiological agent by the vulnerable population of the different municipalities, and an apparent weakness of the health education programs in Aragua state is inferred.

Key words: rickettsiales, monocytes, tick-borne diseases, zoonoses.

Recibido: 21/09/2019 - Aprobado: 06/05/2020

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos rickettsiales, principalmente los del género *Ehrlichia* son patógenos zoonóticos emergentes y reemergentes causantes de una enfermedad infecciosa, trasmisible, no contagiosa, cuya severidad puede variar desde una simple infección asintomática, hasta una enfermedad con afectación de diferentes órganos que puede producir la muerte en humanos y animales (Arraga 1994).

La ehrlichiosis humana es transmitida por la mordedura de garrapatas (*Ixodes*) procedentes de animales enfermos o portadores, como perros, gatos, bovinos, ratones, venados y equinos, entre otros (Rikihisa 2010, Dolz *et al.* 2013). Su distribución está totalmente relacionada con la del vector, la garrapata del perro (*Rhipicephalus sanguineus*). La misma está adaptada a condiciones cálidas y secas, por lo que su presencia se reporta principalmente en países tropicales y subtropicales (Rodríguez y Rincón 2017). Se ha reportado que, en ambientes cálidos, este vector propende a alimentarse de hospederos humanos (Parola *et al.* 2008), lo que incrementa el riesgo de transmisión zoonótica de agentes como *Ehrlichia*, en áreas con condiciones climáticas más cálidas y prolongadas (Shahrzad *et al.* 2016).

El género *Ehrlichia* pertenece al Filo Alpha Protobacterias, orden Rickettsiales y a la familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.* 2001, NCBI 2019). Es una bacteria Gram negativa, pleomórfica e intracelular con diámetro entre 0,2 y 0,8 μm (Oteo y Brouqui 2005, Rikihisa 2010), reportándose además su distribución universal. Presenta tropismo por las células sanguíneas e invaden su citoplasma alojándose dentro de una vacuola, donde se multiplica por fisión binaria dando origen a un agregado de la bacteria o microcolonia (mórula) visible en frotis sanguíneos al microscopio óptico (De Tami y Tami 2004, Silva *et al.* 2014).

Entre los métodos de diagnóstico descritos para esta patología están, el frotis coloreado de sangre periférica y de capa blanca, técnicas serológicas y de biología molecular (Hernández y Marien 2013). En pacientes humanos y animales, la presencia de inclusiones citoplasmáticas en el frotis de capa blanca (FCB), indica un resultado

positivo de infección. No obstante, es posible el diagnóstico de falsos positivos al confundirse estas inclusiones con otras estructuras intracitoplasmáticas. Se ha reportado un 66% de sensibilidad para este método diagnóstico, además la imposibilidad de detección de bajas cantidades de bacterias circulantes en sangre y dificultad para realizar una diferenciación morfológica (Mylonakis *et al.* 2003, Dolz *et al.* 2013, Mylonakis y Theodorou 2017).

Se han estudiado tres especies del género *Ehrlichia* que afectan a los humanos, cada una responsable de un síndrome clínico asociado al tipo de leucocito que infectan: *Anaplasma phagocytophilum* microorganismo que afecta a los granulocitos y causa anaplasmosis granulocítica humana (AGH); *Ehrlichia chaffeensis*, afecta a monocitos/macrófagos y causa la ehrlichiosis monocítica humana (EMH); *Ehrlichia ewingii*, invade neutrófilos y es agente causal de ehrlichiosis humana ewingii (EHE). Esta última afecta de modo preferencial a individuos inmunodeprimidos (Rikihisa 2010, Hidron *et al.* 2014).

El ciclo epidemiológico de la ehrlichiosis humana requiere de un mamífero como reservorio y de un artrópodo como vector. Esta enfermedad presenta un periodo de incubación entre 7 y 21 días y sus síntomas característicos son: fiebre, cefalea, náusea, mialgias, pérdida de peso, escalofrío, falta de apetito y anemia. Según los hallazgos clínicos, puede confundirse con una enfermedad gripal o una mononucleosis infecciosa (Mesa y Somarriba 2015). Se ha reportado la presentación de tres cuadros clínicos: agudo, con los síntomas mencionados anteriormente; subclínico, que es asintomático, y el crónico, con cuadros febriles esporádicos (Silva *et al.* 2014).

En Colombia se ha observado una seroprevalencia de *Ehrlichia sp* de 3,3% en las personas evaluadas (trabajadores rurales), con un incremento de la incidencia en los meses de mayo-agosto. Se detectó mayor afectación de los individuos con edades próximas a los 50 años, con un ligero predominio del sexo masculino (57 a 61%), probablemente relacionado con el mayor número de actividades rurales por parte del trabajador (Hidron *et al.* 2014). Otro estudio

realizado en Perú, reportó 31,6% de seroprevalencia de *Ehrlichia chaffeensis* en 95 propietarios de caninos, con mayor frecuencia de afectación del género femenino (32,7 %) y en 38,7% de pacientes menores de 40 años (Gómez *et al.* (2017).

La ehrlichiosis constituye una zoonosis de importancia para la salud pública y es considerada como un problema emergente (Oteo y Brouqui 2005). En Venezuela se reportó una prevalencia del 30% en pacientes con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis monocítica humana, admitidos en la sala de emergencia hospitalaria (Pérez *et al.* 2006). No obstante, en la actualidad no se dispone de datos que ofrezcan una visión completa de su distribución y prevalencia, que permita conocer la magnitud de su presentación. De acuerdo con González (2018), la ehrlichiosis es una zoonosis poco reconocida en Venezuela, con una morbimortalidad alta de no efectuarse un diagnóstico y tratamiento oportuno. De igual forma, plantea a la comunidad médica la consideración de la erlichiosis como una entidad clínica emergente en nuestro país.

Con base en lo anterior y en el marco del enfoque intersectorial “Una Sola Salud” dirigido a mejorar la prevención y control de los riesgos sanitarios en la interfaz animal – hombre – ecosistema (Cook *et al.* 2004, Stephen y Karesh 2014), se planteó este estudio inicial sobre la situación de esta zoonosis, cuyo objetivo fue reportar la presencia de estructuras citoplasmáticas en monocitos compatibles con *Ehrlichia* sp., en muestras sanguíneas humanas colectadas en diferentes municipios del estado Aragua durante el lapso 2015-2017, de acuerdo a las variables edad, sexo, mes de presentación y municipio de procedencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del lugar de estudio

Los datos fueron recopilados en la unidad de epidemiología y en el laboratorio de parasitología del núcleo de Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones

Agrícolas (INIA), ubicado en Maracay, estado Aragua, Venezuela.

El estado Aragua se encuentra situado en la región centro norte del país, entre 09°23'06" a 10°32'38"N y 66°32'50" a 67°52'54"O (INE 2013). El régimen de pluviosidad para la ciudad de Maracay se define como biestacional, con una estación seca o semiseca y otra lluviosa o semilluviosa, con mayor precipitación desde abril, mayo o junio durante cuatro meses o más (Silva 2010).

Recopilación de la información

Los datos fueron obtenidos a partir de los protocolos de recepción de 613 muestras de sangre de pacientes humanos, remitidas al laboratorio de parasitología con historia clínica y síntomas compatibles con la enfermedad, además de sospecha de contagio por animales domésticos y fauna silvestre.

Investigación epidemiológica

Se aplicó una encuesta epidemiológica a los protocolos de recepción de 613 muestras. En los formularios se compiló información inherente al paciente que incluyó identificación, sexo, edad, procedencia geográfica, remisión médica (oficial o privada), mes del año, fecha de inicio de los síntomas, conservación de la muestra, contacto con posibles vectores, signos clínicos presentes, ocupación laboral y tratamiento médico recibido.

A partir de los protocolos de recepción de las muestras positivas, se realizó un estudio de tipo descriptivo que incluyó las variables edad, sexo, mes del año y municipio de procedencia. Las muestras sanguíneas de los pacientes que se incluyeron en el estudio fueron remitidas desde hospitales públicos y privados ubicados en diferentes municipios del estado Aragua. Todos los pacientes presentaron antecedentes de enfermedad febril y contacto estrecho con perros (*Canis lupus familiaris*).

Visualización de microorganismos

La presencia de *Ehrlichia* sp., se estableció mediante FCB, método de rutina utilizado en el laboratorio de parasitología para los estudios de

hemotrópicos de interés veterinario. El frotis fue realizado a partir de sangre completa preservada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), las muestras de interés fueron centrifugadas en microtubos capilares, en una centrifuga Clay Adams Autocrit II, durante cinco minutos. La capa blanca fue obtenida mediante corte de los capilares por encima de los eritrocitos compactados, asegurando una cantidad adecuada de leucocitos y plaquetas. Los frotis obtenidos se tiñeron con Giemsa. La visualización se realizó por medio de microscopía óptica, (microscopio primo star Carl Zeiss) utilizando objetivo de inmersión 100X. La muestra se consideró positiva cuando se observaron mórulas o cuerpos de inclusión intracitoplasmáticas.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron ordenados y analizados mediante la aplicación Excel®. Se calcularon frecuencias absolutas y relativas de los casos positivos, de acuerdo a edad, sexo, municipio de procedencia y mes de presentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra la frecuencia con que fueron detectadas estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp. en monocitos de muestras sanguíneas provenientes de pacientes humanos

Hernández y Marien (2013) mencionan que entre un 20 y 80 % de los pacientes humanos, presentan inclusiones o mórulas en el citoplasma de los leucocitos/plaquetas de sangre periférica durante la primera semana de la infección. Lo que indica que la visualización o confirmación microscópica mediante frotis coloreado se puede realizar en este periodo. Otros autores recomiendan adicional a lo anterior, considerar criterios clínicos en el paciente para emitir un

Cuadro 1. Número total de muestras sanguíneas humanas con presencia de estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., durante el periodo 2015 - 2017

Total de muestras	Positivas (+)	Negativas (-)	(%)
613	137	476	22,3

diagnóstico positivo a *Ehrlichia* sp., tales como fiebre y antecedentes de mordeduras de garrapatas (Oteo y Brouqui 2005).

En la interpretación de los datos que se exponen en este trabajo, debe considerarse que esta técnica de laboratorio tiene una alta especificidad, pero baja sensibilidad. Esto significa que el hallazgo de mórulas en las células sanguíneas diana, indica presencia de la enfermedad; no obstante, la ausencia de estas estructuras citoplasmáticas no descarta la presencia de la bacteria en sangre circulante.

Lo anterior puede conducir a diagnósticos erróneos (falsos negativos), debido a que la bacteriemia muestra ciclicidad transitoria y en algunas etapas se encontrará con números bajos según el curso de la infección (Parrado *et al.* 2003). Otros autores consideran la prueba de FCB como de baja sensibilidad y especificidad. De igual forma, destacan la dificultad para la observación de las inclusiones en las células hemáticas mononucleadas, el tiempo que consume y la necesidad de contar con personal laboratorio con altas destrezas para realizar la técnica (Gutiérrez *et al.* 2016).

En la Figura 1 se muestran los casos que presentaron estructuras citoplasmáticas en monocitos y su relación con la variable edad. El rango de edad de los pacientes con diagnóstico positivo a *Ehrlichia* sp., estuvo entre 1 y 75 años, con un promedio general de 25 años. El número más alto de casos positivos correspondió al grupo ubicado entre 0 a 4 años, luego el grupo de 5 a 9 años, después el grupo de 10 a 14 años.

De igual forma, se observó una mayor concentración de casos positivos en las personas menores de 40 años (112 casos). Estos resultados coinciden con los mencionados por Gómez *et al.* (2017), quienes señalan a los menores de 40 años como los más afectados. Por su parte, Meštrovic (2018) determinó que la edad mediana para detectar la ehrlichiosis se ubica entre los 51 a 53 años.

En el presente estudio no se recolectaron datos adicionales que permitieran establecer el vínculo entre los casos positivos y la edad. No obstante, Gómez *et al.* (2017), relacionan el mayor porcentaje

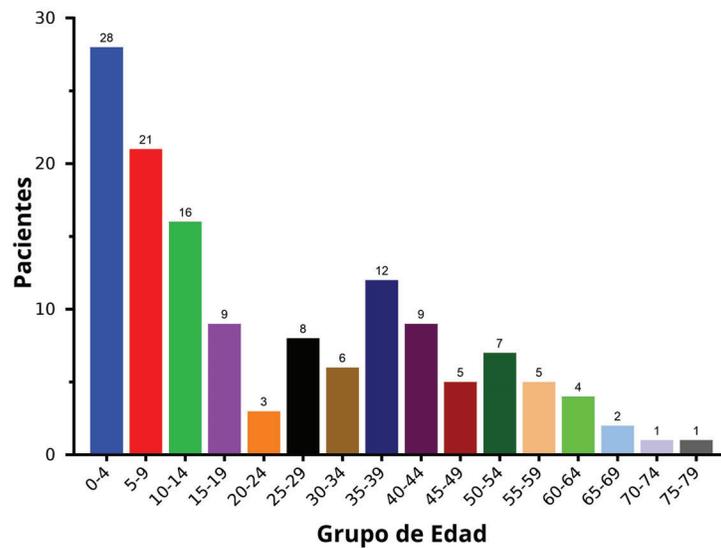


Figura 1. Distribución por edad de pacientes con estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., en muestras evaluadas durante el periodo 2015-2017

de positividad en personas menores a 40 años, a un mayor contacto doméstico con animales infectados. Estos autores de igual forma mencionan que el factor de riesgo de mayor impacto es la exposición a garrapatas, debido a que son los transmisores de la enfermedad.

Los resultados de la evaluación de acuerdo al género, se muestran en el Cuadro 2. Estos datos coinciden con lo mencionado por Gómez *et al.* (2017), quienes detectaron mayor frecuencia de seropositividad a *Ehrlichia chaffeensis*, en el género femenino. Mientras que Meštrovic (2018), reportó al género masculino como el grupo más afectado.

En cuanto a la distribución territorial, se observó una mayor proporción de muestras con evidencia

de estructuras microbianas compatibles con *Ehrlichia* sp., en los municipios Girardot, Santiago Mariño, Mario Briceño Iragorry y Francisco Linares Alcántara (Cuadro 3), señalados como los más poblados del estado Aragua. Las demás entidades municipales del estado mostraron porcentajes muy bajos. En cuanto a los municipios Bolívar y San Casimiro, no se recibieron muestras desde estas entidades para el despistaje de hemotrópicos.

Es notorio el mayor número de casos positivos en los municipios con menor porcentaje de población rural, como Girardot, Santiago Mariño y Mario Briceño Iragorry (INE 2011). Mientras que el municipio Urdaneta con 61,66 % de población rural, presentó un valor bajo de reporte de pacientes (Figura 2). Se infiere que la subestimación en la sospecha o notificación de la enfermedad, puede ser una posible causa. De acuerdo a la revisión realizada por Ramírez *et al.* (2008), *Rhipicephalus sanguineus* ha sido reportada como una especie común en los alrededores de las construcciones humanas, y se la considera una especie intradomiciliaria que infesta al hombre con frecuencia. Lo anterior podría relacionarse con el mayor número de pacientes positivos en los municipios urbanos, con una mayor densidad de población y de edificaciones. En cuanto a los municipios

Cuadro 2. Distribución por género, de pacientes humanos con presencia de estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., durante el periodo 2015 - 2017

Género	Pacientes totales	Pacientes positivos	(%)
Masculino	336	66	19,64
Femenino	277	71	25,63
Total	613	137	22,34

Cuadro 3. Distribución relativa municipal de pacientes humanos con presencia de estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., durante el periodo 2015 - 2017

Municipios	Pacientes (%)
Girardot	52,5
Santiago Mariño	13,1
Mario Briceño Iragorry	8,7
Linares Alcántara	8,7
Libertador	6,5
Sucre	2,1
Zamora	2,1
Camatagua	1,4
Santos Michelena	1,4
José Félix Ribas	0,7
Urdaneta	0,7
José Ángel Lamas	0,7
José Rafael Revenga	0,7
Total	100

Urdaneta y Camatagua, con mayor población rural, se infiere una mayor circulación de los vectores *Rhipicephalus microplus* y *Amblyoma* sp. No obstante, esto debe ser evaluado en estudios epidemiológicos posteriores.

La proporción y el número de casos reflejados en el municipio José Félix Ribas (0,7 % y 1 respectivamente), no coincide con reportes previos sobre casos de ehrlichiosis humana (Martínez *et al.* 2015). Un aspecto a resaltar es que en este municipio se encuentra la segunda ciudad más poblada del estado Aragua (La Victoria), de lo que se infiere la presencia de factores de riesgo como la tenencia de mascotas, cercanía de perros callejeros a los seres humanos además de la circulación del vector. Lo anterior requiere la consideración y vigilancia de esta zoonosis por parte de los profesionales de la salud, como un problema de salud pública (González y Loaiza 2012, Almao *et al.* 2013, Gutiérrez *et al.* 2016).

La evaluación de la distribución mensual de pacientes con presencia de inclusiones

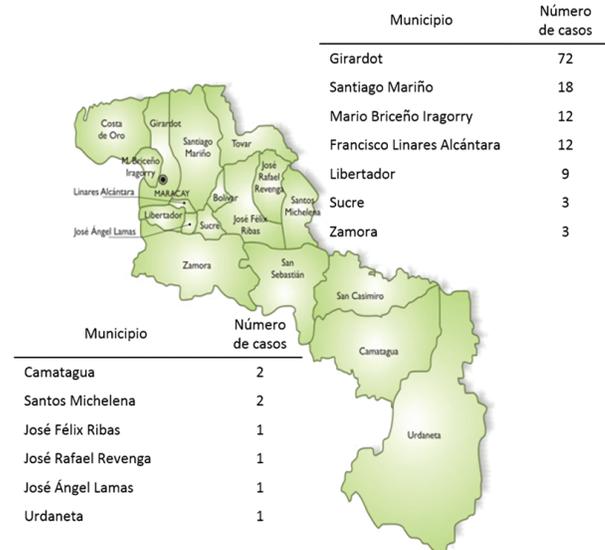


Figura 2. Distribución municipal de pacientes con presencia de estructuras citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., durante el periodo 2015 - 2017. Fuente mapa https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aragua_mapa_municipal.jpg

citoplasmáticas en monocitos, durante el lapso 2015 – 2017, reflejó la presentación de los casos durante todo el periodo, con una mayor frecuencia absoluta entre los meses junio y septiembre (Figura 3). La frecuencia relativa de los casos en relación a los periodos de lluvias (mayo – octubre) y sequía (noviembre – abril), se observa en la Figura 4. Esta información coincide con un estudio realizado por Hidron *et al.* (2014) en Colombia, quienes reportaron una mayor presentación de la enfermedad desde abril hasta septiembre, período que coincide con la mayor actividad de los posibles vectores (garrapatas).

Las condiciones climáticas del estado Aragua favorecen el ciclo biológico del vector de la ehrlichiosis durante todo el año. De acuerdo a los datos climatológicos aportados por el INAMEH (2019), las temperaturas en el estado Aragua pueden oscilar entre 29,4°C y 30,3°C en un año, rango favorable para el vector. Por otra parte, es conocida la relación existente entre la presencia de caninos, bien sea como mascotas domésticas o animales callejeros y el vector *R. sanguineus*, lo que incrementa la probabilidad de contacto

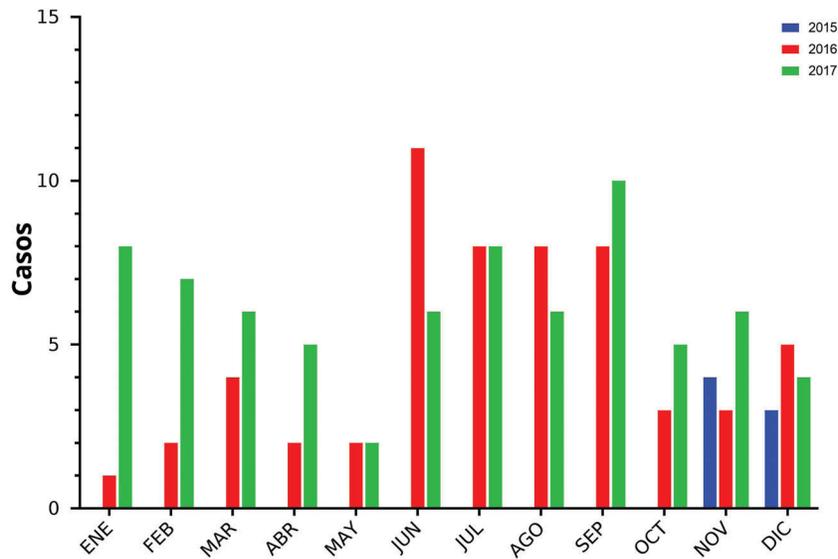


Figura 3. Distribución mensual de pacientes humanos con inclusiones citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., durante el lapso 2015 - 2017

de los seres humanos con el microorganismo y consecuentemente la posibilidad de una zoonosis (Weinborn *et al.* 2018). Se ha reportado el papel de los animales de compañía, otros mamíferos sinántropicos y aves, en la transmisión de poblaciones de garrapatas y como reservorios de patógenos (Ionita *et al.* 2016).

Los factores mencionados en el párrafo anterior permiten inferir la permanencia en el estado Aragua, de un nicho de bacteriemia en el reservorio animal. Lo anterior promueve condiciones que facilitan la transmisión de la ehrlichiosis a la población humana de los diferentes municipios del estado Aragua, durante todos los meses del año (Quijada *et al.* 2012).

Como consideraciones finales de la discusión se puede agregar que la combinación del crecimiento de la población humana y animal, la degradación ambiental, los cambios climáticos, las deficiencias en la salud pública (ausencia de programas de control de vectores), entre otros aspectos, incrementa el riesgo de transmisión de enfermedades por vectores y las consiguientes zoonosis.

Así mismo, se considera fundamental la tenencia responsable de animales de compañía y la educación para la promoción de la salud vista

desde el concepto “Una Sola Salud” (Cook *et al.* 2004, Stephen y Karesh 2014). En tal sentido, esta zoonosis debe ser abordada tanto por médicos veterinarios como personal de salud humana con el fin de concientizar mediante educación sanitaria, a los propietarios de mascotas en aspectos relacionados al control de los vectores y de esta manera minimizar el riesgo de esta zoonosis.

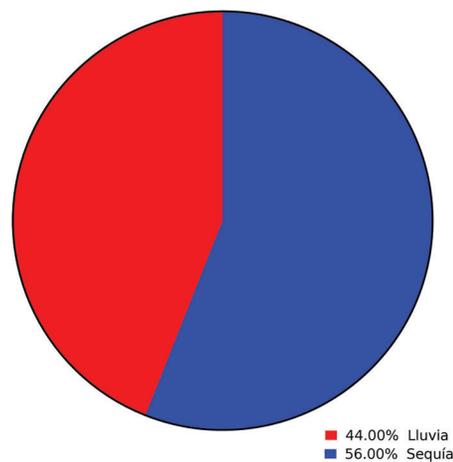


Figura 4. Distribución porcentual de pacientes humanos con inclusiones citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp., de acuerdo a los periodos de lluvia y sequía, durante el periodo 2015 - 2017

CONCLUSIONES

Este estudio reveló un 22,3 % de positividad a la presencia de inclusiones citoplasmáticas compatibles con *Ehrlichia* sp. en muestras sanguíneas humanas colectadas en 13 municipios del estado Aragua, Venezuela.

Se observó una concentración de casos positivos en individuos menores a los 40 años, con los mayores números de casos en los grupos de edad 0-4 años, 5-9 años y 10-14 años.

El género femenino presentó una mayor proporción de casos positivos (25,63 %), comparado con el género masculino (19,64 %).

Los municipios con la mayor concentración de población urbana (Girardot, Santiago Mariño, Mario Briceño Iragorry), presentaron un mayor número de casos positivos.

El mayor número de reportes de casos positivos coincidió con el periodo de lluvias, durante el lapso evaluado.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no presentan conflicto de interés en la publicación de este artículo y los aportes al mismo fueron de manera equitativa.

LITERATURA CITADA

- Almao, M; García, M; Mujica, R. 2013. *Ehrlichia canis* en el caserío “La Isla”, municipio Palavecino, estado Lara. Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara 5(1):33-47.
- Arraga, C. 1994. Ehrlichiosis Humana. Revisión. Investigación Clínica 35(4):209-222.
- Cook, RA; Kares, WB; Osofsk, SA. 2004. The Manhattan Principles on “One World, One Health” (en línea). In One World, One Health: building interdisciplinary bridges to health in a globalized world Conference (1, 2004, EEUU). Conference summary. Nueva York, EEUU. Wildlife Conservation Society. Consultado 15 feb. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31deNOS>
- De Tami, IC; Tami-Maury, IM. 2004. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana en Venezuela. Revista Panamericana de Salud Pública 16(5):345-349.
- Dolz, Á; Romero, LE; Campos-Calderón, L; Bouza-Mora, L; Jiménez-Rocha, AE. 2013. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Costa Rica. Acta Médica Costarricense 55(supl.1):34-40.
- Dumler, J; Barbet, A; Bekker, C; Dasch, G; Palmer, G; Ray, S; Rikihisa, Y; Rurangirwa, F. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51(6):2145–2165.
- González, H; Loaiza, J. 2012. Medición de la concordancia en el diagnóstico entre la prueba de Elisa y el cuadro hemático mediante un estudio paraclínico-epidemiológico de la *Ehrlichia canis*. Revista Colombiana Ciencia Animal 5(1):47-51.
- González, Y. 2018. Ehrlichiosis monocítica humana y babesiosis en Venezuela. Reporte de caso. Revista Médica Risaralda 24(2):125-132.
- Gómez, MB; Li E, O; Hoyos, SL; Manchego, SA; Suárez, AF. 2017. Detección de anticuerpos contra *Ehrlichia spp* en propietarios de caninos domésticos con Ehrlichiosis. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 28(4):939-946.
- Gutiérrez, C; Pérez, L; Agrela, I. 2016. Ehrlichiosis canina. Saber Universidad de Oriente 28(4):641-665.
- Hernández, H; Marien, S. 2013. Entendiendo las ehrlichiosis humanas destacando a un agente causal: *Anaplasma phagocytophilum*. Revista Ciencias Biomédicas 4(1):165-169.

- Hidron, A; Muñoz, F; Vega, J. 2014. Primer caso de ehrlichiosis monocítica humana reportado en Colombia (en línea). Asociación Colombiana de Infectología 18(4):162-166. Consultado 15 feb. 2018. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.00>
- INAMEH (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología) 2019. Pronósticos de tres categorías de temperatura máxima media por trimestres para cada estado de Venezuela (en línea). Consultado 15 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/2Ygkp90>
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2011. XIV Censo Nacional de Población y Vivienda. Indicadores demográficos (en línea). Consultado 15 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/2EaqZqP>
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2013. Aragua (en línea). Consultado 15 may. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3l0Sq76>
- Ionita, M; Silaghi, C; Mitrea, IL; Edouard, S; Parola, P; Pfister, K. 2016. Molecular detection of *Rickettsia conorii* and other zoonotic spotted fever group rickettsiae in ticks, Romania. Ticks and tick-borne diseases 7(1):150-153.
- Martínez A, MC; Arraga-Alvarado, CM; Triana-Alonso, FJ; Ruiz C, JA; Gutiérrez G, CN. 2015. Estudio serológico y molecular de *Ehrlichia canis* en perros de una comunidad del estado Aragua, Venezuela. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 26(4):648-656.
- Meštrović, T. 2018. Epidemiología de Ehrlichiosis (en línea). Consultado 16 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2YbP4nS>
- Meza, J; Somarriba, M. 2015. Determinación de la prevalencia de ehrlichiosis canina en perros de la ciudad de León mediante frotis de serie blanca teñidos con Giemsa en el periodo noviembre – diciembre 2014. Tesis de Grado. Universidad Autónoma de Nicaragua. León, Nicaragua. 39 p.
- Mylonakis, M; Koutinas, A; Billinis, C; Leontides, L; Kontos, V; Papadopoulos, O; Rallis, T; Fytianou, A. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Veterinary Microbiology 91(2-3):197-204.
- Mylonakis, M; Theodorou, K. 2017. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update on Diagnosis and Treatment. Acta Veterinaria 67(3):299-317.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2019. Taxonomy browser. USA (en línea) Consultado 16 may. 2020. Disponible en <https://bit.ly/2Q98eGw>
- Oteo, J; Brouqui, P. 2005. Ehrlichiosis y Anaplasmosis humana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 23(6):375-380.
- Parola, P; Socolovschi, C; Jeanjean, L; Bitam, I; Fournier, PE; Sotou, A; Labauge, P; Raoul, D. 2008. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses (en línea). PLOS Neglected Tropical Diseases 2(11):e338. Consultado 16 may. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000338>
- Parrado, M; Vargas, F; Hernández, G; Vergara, H. 2003. Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneo en caninos con sintomatología compatible de ehrlichiosis. Revista Orinoquía 7(1-2):6-11.
- Pérez, M; Bodor, M; Zhang, C; Xiong, Q; Rikhisa, Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela (en línea). Annals of the New York Academy of Sciences 1078(1):110-117. Consultado 16 may. 2020. Disponible en DOI:10.1196/annals.1374.016
- Quijada, J; García, M; Sánchez, G; Bethencourt, A; Medina, O; Vivas, I; Pérez, A; García, H. 2012. Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de Venezuela (en línea). Revista Veterinaria 13(8):1-16. Consultado 05 mar. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3l2c6qY>
- Ramírez-Barrios, R; Chacón, E; Barboza, G; Fernández, G; Valera, Z; Villalobos, A; Angulo-Cubillón, F. 2008. Garrapatas (Acari: Ixodidae) recolectadas de caninos bajo asistencia veterinaria en Maracaibo, Venezuela. Revista Científica 18(3):267-270.

- Rikihisa, Y. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews Microbiology* 8(5):328-339.
- Rodríguez, L; Rincón, J. 2017. Revisión sistemática: Prevalencia y tratamiento de Ehrlichiosis en humanos y caninos de países tropicales de América (en línea). Trabajo de Grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Consultado 21 mar. 2018. Disponible en <https://bit.ly/326kqNN>
- Shahrzad, M; Akhtardanesh, B; Ghanbarpour, R; Aflatoonian, M; Khalili, M; Nourollahifard, S. 2016. Ehrlichiosis in Household Dogs and Parasitized Ticks in Kerman-Iran: Preliminary Zoonotic Risk Assessment (en línea). *Journal of Arthropod- Borne Diseases* 10(2):246-252. Consultado 18 abr. 2018. Disponible en <https://bit.ly/32cWKaS>
- Silva, A; Pina, S; Gabriel de la Torre, M; Mayoral, A; Mayoral, M; Pérez-Campos, L; López, J; Pérez-Campos. E. 2014. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. *Gaceta Médica de México* 150(2):171-174.
- Silva, G. 2010. Tipos y subtipos climáticos de Venezuela (en línea). Trabajo de ascenso. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. p. 41. Consultado 18 abr. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2Q98zJi>
- Stephen, C; Karesh, WB. 2014. ¿Está resultando fructífero el concepto de “Una sola salud”? (en línea). *Revista científica y técnica OIE* 33(2):387-392. Consultado 18 abr. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3g5Pm5W>
- Weinborn, R; Zanelli, M; López, Ó; Pau, N; Valdés, F. 2018. Anticuerpos anti-*Anaplasma* spp. en población de riesgo ocupacional de un hospital veterinario. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 29(2):594-601.