

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 63, No 2 (2012)



### Clinical relevance of serologic testing in canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*)

M. E. MYLONAKIS (Μ.Ε. ΜΥΛΩΝΑΚΗΣ), A. F. KOUTINAS (Α.Φ. ΚΟΥΤΙΝΑΣ), K. THEODOROU (Κ. ΘΕΟΔΩΡΟΥ), V. I. SIARKOU (Β.Ι. ΣΙΑΡΚΟΥ), V. I. KONTOS (Β.Ι. ΚΟΝΤΟΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15428](https://doi.org/10.12681/jhvms.15428)

#### To cite this article:

MYLONAKIS (Μ.Ε. ΜΥΛΩΝΑΚΗΣ) M. E., KOUTINAS (Α.Φ. ΚΟΥΤΙΝΑΣ) A. F., THEODOROU (Κ. ΘΕΟΔΩΡΟΥ) K., SIARKOU (Β.Ι. ΣΙΑΡΚΟΥ) V. I., & KONTOS (Β.Ι. ΚΟΝΤΟΣ) V. I. (2017). Clinical relevance of serologic testing in canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 63(2), 127–134. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15428>

## Clinical relevance of serologic testing in canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*)

Mylonakis M. E.<sup>1</sup>, Koutinas A. F.<sup>1</sup>, Theodorou K.<sup>1</sup>, Siarkou V. I.<sup>2</sup>, Kontos V. I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Companion Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki., Greece

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

<sup>3</sup>Department of Veterinary Public Health, National School of Public Health, Athens, Greece

## Η κλινική χρησιμότητα των ορολογικών δοκιμών στη μονοκυτταρική ερλιχίωση (*Ehrlichia canis*) του σκύλου

M. E. Μυλωνάκης<sup>1</sup>, Α. Φ. Κουτίνας<sup>1</sup>, Κ. Θεοδώρου<sup>1</sup>, Β. Ι. Σιάρκου<sup>2</sup>, Β. Ι. Κοντός<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Κλινική των Ζώων Συντροφιάς, Κτηνιατρική Σχολή, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη

<sup>3</sup>Τομέας Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα

### Abstract

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is primarily caused by *Ehrlichia canis*, a member of the genus *Ehrlichia* (family: Anaplasmataceae). Serology is the most frequently used diagnostic modality in CME. Indirect fluorescent antibody (IFA) testing remains the “gold standard” for the detection and titration of the *E. canis*-specific antibodies; in addition, several user-friendly, in-clinic assays have recently gained tremendous popularity due to their practical and cost-effective nature. The latter assays provide mostly qualitative results and have a high diagnostic specificity; however, their sensitivity usually declines when the IFA-titers are lower than 1/320, suggesting a suboptimal performance in acutely infected dogs. Overall, a positive IgG antibody titer indicates past exposure to and infection by *Ehrlichia canis* or a closely related agent (e.g. *E. chaffeensis*, *E. ewingii*), while rarely, true false positives may adversely affect the interpretation. As a rule, a negative IgG antibody titer rules out exposure to *E. canis*, with the notable exception of the acute CME in which clinical and clinico-pathological manifestations may precede seroconversion which occurs 7-35 days post-infection. The latter problem may be overcome by testing paired serum samples obtained 2-3 weeks apart. Unlike IgG antibodies, IgM titers develop inconsistently in the course of the infection, thus, not justifying their routine measurement for diagnostic purposes. Importantly, IgG antibody titers do not reliably correlate with the duration of infection, the current carrier status, or the presence and severity of clinical disease. Because of the prolonged latent period and the persistent seropositivity following therapy or

Correspondence: Mylonakis M. E.  
18, Kyprou str., 551 33 Thessaloniki, Greece  
Tel.: +30 2310 994495, E-mail: mmylonak@vet.auth.gr

Αλληλογραφία: Μαθιός Ε. Μυλωνάκης  
Κύπρου 18, ΤΚ 55133, Θεσσαλονίκη  
Τηλέφωνο: 2310 994495, E-mail: mmylonak@vet.auth.gr

Submission date: 29.12.2011  
Acceptance date: 24.02.2012

Ημερομηνία υποβολής: 29.12.2011  
Ημερομηνία αποδοχής: 24.02.2012

self-eradication of the infection, clinicians should be well aware that seroreactivity to *E. canis*, especially in an endemic area, does not unequivocally confirm that the clinical manifestations and the clinicopathological abnormalities are due to *E. canis* infection. The decision to treat a clinically healthy, seropositive dog may be particularly challenging, especially in endemic areas. A positive or negative polymerase chain reaction (PCR) result dictates towards or against treatment, respectively. If PCR is not available, the proper course of action should be decided on a case-by-case basis. The authors suggest treating these dogs if they are thrombocytopenic and/or hyperglobulinemic and no other potential causes of these abnormalities (e.g. pseudothrombocytopenia and/or comorbid conditions) can be demonstrated. The antibody kinetics is quite unpredictable, frequently persisting several months to years following eradication of the organism, which limits the value of serology as a post-treatment monitoring tool. This review article addresses a series of questions pertaining to the interpretation of *E. canis*-specific serology in the context of the clinical phase of the disease, the antibody kinetics, the sensitivity and specificity of the assays and the prior treatment status. The ultimate goal is to facilitate the clinical decision-making towards the diagnosis and post-treatment monitoring of the CME.

**Keywords:** *Ehrlichia canis*, dog, serology, interpretation, diagnosis

### Περίληψη

Η *Ehrlichia canis*, μέλος της οικογένειας Anaplasmataceae, παρουσιάζει παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση και αποτελεί το κυριότερο αίτιο της μονοκυτταρικής ερλιχίωσης στο σκύλο (ΜΕΣ). Η διάγνωση, εκτός από τη συμβατή κλινική και αιματολογική εικόνα, τις περισσότερες φορές βασίζεται στον έμμεσο ανοσοφθορισμό και στις ιδιαίτερα δημοφιλείς εμπορικές ορολογικές τεχνικές που πραγματοποιούνται στο χώρο του ιατρείου, με τις οποίες ανιχνεύονται τα ειδικά IgG αντισώματα κατά της *E. canis*. Οι τελευταίες τεχνικές είναι κατά κανόνα ποιοτικές ή ημιποσοτικές και χαρακτηρίζονται από υψηλή διαγνωστική ειδικότητα, ωστόσο, η ευαισθησία τους μειώνεται σημαντικά σε τίτλους <1/320, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα οροαρνητικών σκύλων στην οξεία ΜΕΣ. Κατά κανόνα, ένας θετικός τίτλος IgG αντισωμάτων, υποδηλώνει μόλυνση από την *E. canis* ή κάποιο αντιγονικά παρόμοιο μικροοργανισμό (π.χ. *E. chaffeensis*, *E. ewingii*), ενώ σπάνια, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ψευδώς θετικό. Ένα αρνητικό ορολογικό αποτέλεσμα, συνήθως αποκλείει την μόλυνση από την *E. canis*, με την εξαίρεση της οξείας ΜΕΣ όπου η εκδήλωση των συμπτωμάτων και των αιματολογικών διαταραχών ενδέχεται να προηγηθεί του ανιχνεύσιμου τίτλου (7-35 ημέρες μετά τη μόλυνση) αντισωμάτων. Στην τελευταία περίπτωση, η λήψη και εξέταση ζευγους ορών, σε μεσοδιάστημα 2-3 εβδομάδων, μπορούν να επιβεβαιώσουν την διάγνωση. Ο προσδιορισμός του τίτλου των IgM αντισωμάτων δεν φαίνεται να υπερέχει ή να προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες σε σύγκριση με εκείνο των IgG και ως εκ τούτου, δεν συστήνεται ως διαγνωστική εξέταση ρουτίνας. Σημειώνεται ότι το θετικό ορολογικό αποτέλεσμα, δεν υποδηλώνει απαραίτητα ενεργό μόλυνση, ούτε συσχετίζεται με την κλινική φάση της ΜΕΣ ή τη σοβαρότητα της κλινικής εικόνας και ως εκ τούτου, ο κτηνίατρος θα πρέπει να γνωρίζει ότι ένα οροθετικό αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώνει ότι η μόλυνση από την *E. canis* είναι αυτή που ευθύνεται για τα συμπτώματα και τις εργαστηριακές μεταβολές στο συγκεκριμένο σκύλο. Σε χώρες που ενδημεί η ΜΕΣ όπως η Ελλάδα, η λήψη της ορθότερης απόφασης για τη θεραπεία του κλινικά υγιούς οροθετικού σκύλου δεν είναι εύκολη. Εφόσον υπάρχει η δυνατότητα διενέργειας PCR, το θετικό της αποτέλεσμα υποδηλώνει ενεργό μόλυνση και θα πρέπει να γίνεται θεραπεία. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος, η θεραπεία δεν δικαιολογείται. Όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα πραγματοποίησης PCR, η απόφαση λαμβάνεται κατά περίπτωση. Στην περίπτωση σκύλου με θρομβοκυτταροπενία ή/και υπερσφαιριναιμία που δεν οφείλονται σε άλλα αίτια (π.χ. ψευδής θρομβοκυτταροπενία, λείσμανίωση) συστήνεται η ανάληψη θεραπείας. Σημειώνεται, επιπλέον, ότι λόγω της μη προβλέψιμης κινητικής των τίτλων αντισωμάτων μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, οι ορολογικές εξετάσεις δεν είναι κατάλληλες για την επιβεβαίωση της εκρίζωσης της μόλυνσης. Η εργασία αυτή πραγματεύεται μια σειρά ερωτήσεων που τίθενται συχνά στην πράξη και αφορούν αφενός στην αξιοπιστία των ορολογικών δοκιμών για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων έναντι της *E. canis* και αφετέρου στη χρησιμότητά τους για τη διάγνωση της ΜΕΣ και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

**Λέξεις ευρητηρίας:** *Ehrlichia canis*, σκύλος, ορολογική εξέταση, ερμηνεία, διάγνωση

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μονοκυτταρική (μονοκυτταροτρόπος) ερλιχίωση του σκύλου (ΜΕΣ) αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Αλγερία το 1935 (Donatien and Lestoguard 1935) και στην Ελλάδα το 1989 (Koutinas et al. 1989). Η *Ehrlichia canis*, μέλος της οικογένειας Anaplasmataceae, παρουσιάζει παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση και απο-

τελεί το κυριότερο αίτιο της ΜΕΣ (Neer et al. 2002, Cohn 2003, Little 2010). Η *E. chaffeensis*, το αίτιο της μονοκυτταρικής ερλιχίωσης του ανθρώπου, προκαλεί, αν και λιγότερο συχνά, κλινική νόσο και στο σκύλο ανάλογης βαρύτητας με εκείνη της *E. canis*, κυρίως στις νότιες πολιτείες των Η.Π.Α. (Breitschwerdt et al. 1998). Η *E. ewingii*, αποτελεί το αίτιο της κοκκιοκυτταρικής (κοκκιοκυτταροτρόπου) ερλιχίωσης, με την πλειονότητα των

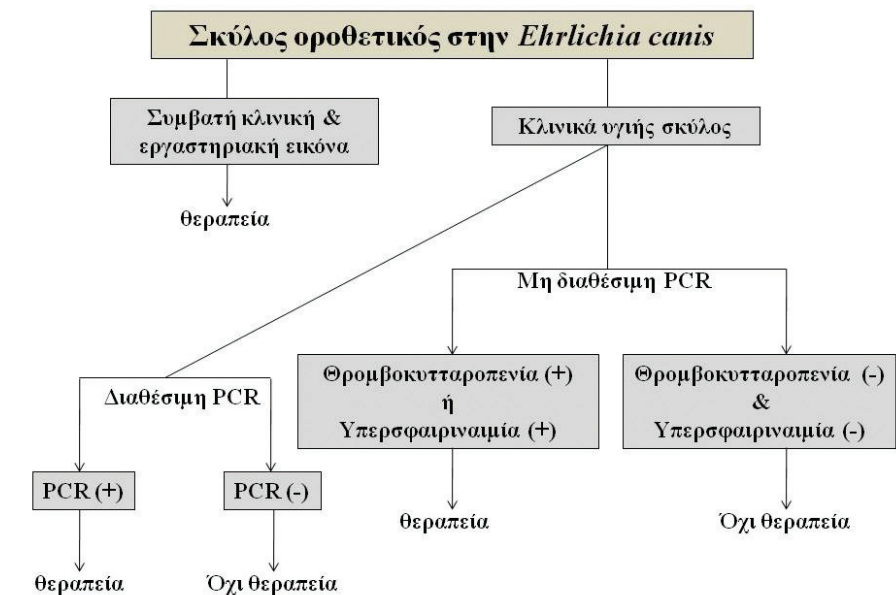
περιστατικών να έχουν διαγνωστεί στις Η.Π.Α. (Little 2010). Επισημαίνεται τέλος, ότι ορισμένα «ιστορικά» είδη του γένους *Ehrlichia*, όπως η *E. equi* και η *E. platys*, ταξινομήθηκαν πρόσφατα στο γένος *Anaplasma* και είναι τα αίτια της κοκκιοκυτταρικής (*A. phagocytophilum*) και θρομβοκυτταρικής (*A. platys*) αναπλάσμωσης, με σχεδόν παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση (Neer and Harrus 2006).

Μετά τη μόλυνση του σκύλου με την *E. canis* από κρότωνες των ειδών *Rhipicephalus sanguineus* και *Dermacentor variabilis* και ύστερα από επώαση 8-20 ημερών, η τυπική κλινική πορεία της νόσου περιλαμβάνει την οξεία (μη μυελοκατασταλτική), την υποκλινική και τη χρόνια (μυελοκατασταλτική) μορφή (Neer and Harrus 2006, Siarkou et al. 2007). Η πλειονότητα των σκύλων με οξεία ΜΕΣ μπορεί να ιαθεί κλινικά ακόμα και χωρίς θεραπεία μέσα σε 2-4 εβδομάδες, περνώντας στην υποκλινική φάση, που μπορεί να διαρκέσει από λίγους μήνες μέχρι αρκετά χρόνια (Codner and Farris-Smith 1986, Waner et al. 1997, Harrus et al. 1998). Οι ανοσοεπαρκείς σκύλοι μπορούν στην φάση αυτή να απαλλαγούν από τη μόλυνση. Ωστόσο, κάτω από αδιευκρίνιστες ακόμα συνθήκες, ένα ποσοστό εκδηλώνει την μυελοκατασταλτική μορφή της ΜΕΣ, που χαρακτηρίζεται από σοβαρή απλασία του μυελού των οστών, παγκυτταροπενία και υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (Harrus et al. 1998, Mylonakis et al. 2004, Harrus and Waner 2011).

Ο πυρετός, η ανορεξία, η κατάπτωση, η απώ-

λεια του σωματικού βάρους, η περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία, η σπληνομεγαλία, η ωχρότητα των βλεννογόνων, οι οφθαλμικές αλλοιώσεις (π.χ. επιεφυκίτιδα, ραγοειδίτιδα, αιμορραγία ή αποκόλληση του αμφιβληστροειδή χιτώνα) και η αιμορραγική διάθεση (π.χ. πετέχειες και εκχυμώσεις στο δέρμα και στους βλεννογόνους, ύφαιμα, επίσταξη, ουλορραγία, αιματουρία), είναι συχνές κλινικές εκδηλώσεις στη ΜΕΣ, αν και με διαφορετική συχνότητα και βαρύτητα μεταξύ των φάσεων της νόσου (Komnenou et al. 2007, Mylonakis et al. 2011). Η θρομβοκυτταροπενία και η αναιμία είναι οι συχνότερες αιματολογικές διαταραχές, με την απλαστική παγκυτταροπενία να χαρακτηρίζει τη μυελοκατασταλτική μορφή της ΜΕΣ (Mylonakis et al. 2011). Στις συχνότερες βιοχημικές διαταραχές περιλαμβάνονται η υπερσφαιριναίμια, η υπολευκωματιναίμια και η αυξημένη δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων (Mylonakis et al. 2011).

Η διάγνωση της ΜΕΣ εκτός από την συμβατή κλινική και αιματολογική εικόνα, βασίζεται α) στην κυτταρολογική εξέταση για την αναζήτηση των χαρακτηριστικών εγκλείστων της *E. canis* σε επιχρίσματα αίματος ή λεμφογαγγλίων, β) σε μοριακές μεθόδους (π.χ. αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, PCR) για την αναζήτηση του ειδικού για την *E. canis* DNA (και οι δύο παραπάνω εξετάσεις επιβεβαιώνουν την ενεργή μόλυνση) και γ) στην ορολογική εξέταση για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων στον ορό του αίματος, που δείχνει την έκθεση (μόλυνση) του



Εικόνα 1. Αλγόριθμος εκτίμησης της αναγκαιότητας χορήγησης θεραπείας σε σκύλους με θετικό τίτλο αντισωμάτων έναντι της *Ehrlichia canis*.

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, (+): θετικό αποτέλεσμα, (-): αρνητικό αποτέλεσμα

σκύλου στον μικροοργανισμό κατά το πρόσφατο ή απώτερο παρελθόν (Harrus and Waner 2011). Στην Ελλάδα που η ΜΕΣ είναι συχνό νόσημα, η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη διάγνωσή της είναι η ορολογική δοκιμή (Mylonakis et al. 2001). Ωστόσο, η ερμηνεία του αποτελέσματός της δεν είναι πάντοτε εύκολη και συχνά ο κτηνίατρος δυσκολεύεται να πάρει ορθές κλινικές αποφάσεις. Η εργασία αυτή πραγματεύεται μία σειρά ερωτήσεων που τίθενται συχνά από τον κλινικό κτηνίατρο σε μια χώρα ενδημική της ΜΕΣ όπως η Ελλάδα και οι οποίες αφορούν αφενός στην αξιοπιστία των ορολογικών δοκιμών για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων έναντι της *E. canis* και αφετέρου στη χρησιμότητά τους για τη διάγνωση της ΜΕΣ και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

## **ΣΥΧΝΕΣ ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΠΑΝΩ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΟΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΤΗ ΜΕΣ**

### **1. Ποια είδη Ehrlichia και Anaplasma έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα σε σκύλους που ζουν στην Ελλάδα για τα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν ορολογικές δοκιμές;**

Με βάση τα αποτελέσματα κυτταρολογικών, ορολογικών και μοριακών (PCR) εξετάσεων σε μια σειρά μελετών, έχει εξακριβωθεί η παρουσία των *E. canis*, *A. phagocytophilum* και *A. platys* (Kontos et al. 1991, Mylonakis et al. 2004, Siarkou et al. 2007).

### **2. Ποιες ορολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συχνότερα στην κλινική πράξη για την ανίχνευση των ειδικών κατά της *E. canis* αντισωμάτων και ποια είναι τα σχετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους;**

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA) και οι πραγματοποιήσιμες στο χώρο του κτηνιατρείου (in-clinic) ορολογικές δοκιμές (ανοσοενζυμικές [ELISA] ή ανοσοχρωματογραφικές), είναι οι περισσότερο διαδεδομένες ορολογικές μέθοδοι στην κλινική πράξη σε ολόκληρο τον κόσμο (Harrus and Waner 2011). Η IFA αποτελεί την ορολογική εξέταση αναφοράς (“gold standard”) για την ανίχνευση και τιτλοποίηση (ποσοτικός προσδιορισμός) των IgG αντισωμάτων κατά της *E. canis*. Ωστόσο, η αξιόπιστη διενέργειά της προϋποθέτει εργαστήριο με εξειδικευμένο εξοπλισμό και τεχνικό προσωπικό (Waner et al. 2000). Οι εμπορικές μέθοδοι, έχουν κατά βάση ποιοτικό (θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα) ή ημιποσοτικό χαρακτήρα. Είναι τεχνικά απλούστερες, δεν απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και προσφέρουν στον κτηνίατρο το πλεονέκτημα του άμεσου αποτελέσματος. Η δυνατότητα όμως της ποσοτικοποίησης του τίτλου των αντισωμάτων, κάνει την IFA καταλληλότερη για την εξέταση ζεύγους ορών (ερώτηση 7) σε περίπτωση διαγνωστικού διλήμματος (Waner et al. 2000, Hegarty et al. 2009).

σμού και τεχνικό προσωπικό (Waner et al. 2000). Οι εμπορικές μέθοδοι, έχουν κατά βάση ποιοτικό (θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα) ή ημιποσοτικό χαρακτήρα. Είναι τεχνικά απλούστερες, δεν απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και προσφέρουν στον κτηνίατρο το πλεονέκτημα του άμεσου αποτελέσματος. Η δυνατότητα όμως της ποσοτικοποίησης του τίτλου των αντισωμάτων, κάνει την IFA καταλληλότερη για την εξέταση ζεύγους ορών (ερώτηση 7) σε περίπτωση διαγνωστικού διλήμματος (Waner et al. 2000, Hegarty et al. 2009).

### **3. Ποια είναι η διαγνωστική αξιοπιστία των εμπορικών ορολογικών μεθόδων που γίνονται στο ιατρείο;**

Από τις πολυάριθμες εμπορικές μεθόδους, λίγες έχουν αξιολογηθεί ως προς τη διαγνωστική ευαισθησία (ποσοστό θετικού αποτελέσματος σε πληθυσμό μολυσμένων σκύλων) και την ειδικότητά τους (ποσοστό αρνητικού αποτελέσματος σε πληθυσμό μη μολυσμένων σκύλων) με καλά σχεδιασμένες μελέτες (Waner et al. 2000, Harrus et al. 2002, Belanger et al. 2002, Seaman et al. 2004, O’ Connor et al. 2006, Okewole and Adejinmi, 2009, Hegarty et al. 2009, Chandrashekar et al. 2010). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν ως αντιγόνο εκχύλισμα ολόκληρου του μικροοργανισμού (Immunocomb *Ehrlichia canis*, Biogal, Israel) ή τα ειδικά πεπτίδια p30 και p30-1 της *E. canis* (Snap 4Dx test kit, IDEXX laboratories, USA), έχουν αξιολογηθεί περισσότερο συστηματικά (Harrus et al. 2002). Με μέθοδο αναφοράς την IFA, η ειδικότητα των τελευταίων προσεγγίζει το 100%, ενώ η ευαισθησία τους είναι περίπου 90% για τίτλους αντισωμάτων >1/320. Η ευαισθησία τους μειώνεται όμως σημαντικά σε τίτλους <1/320 (Harrus et al. 2002, Seaman et al. 2004, O’ Connor et al. 2006, Harrus and Waner 2011). Επομένως, στην οξεία ΜΕΣ και πριν την αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων, η διαγνωστική ευαισθησία των μεθόδων αυτών είναι συνήθως χαμηλή (Gaunt et al. 2010).

### **4. Ποια είναι η κινητική των ειδικών κατά της *E. canis* IgG αντισωμάτων και πώς επηρεάζει το αποτέλεσμα της ορολογικής εξέτασης στην οξεία ΜΕΣ;**

Σε πειραματικές μελέτες, ανιχνεύσιμος τίτλος IgG αντισωμάτων διαπιστώνεται 7-35 ημέρες μετά τη μόλυνση από την *E. canis*, ανάλογα με τη δόση και την

οδό μόλυνσης. Ο τίτλος αυτός συνεχίζει να αυξάνει για 2-3 τουλάχιστον μήνες μετά τη μόλυνση (Weisinger et al. 1975, Gaunt et al. 1996, Waner et al. 2000, Waner et al. 2001, McBride et al. 2003, De Castro et al. 2004). Μετά τον ενδοφλέβιο ενοφθαλμισμό, ο τίτλος IgG αυξάνει νωρίτερα (7-15 ημέρες) σε σύγκριση με τον υποδόριο ή ενδοδερμικό ενοφθαλμισμό (15-35 ημέρες) (Gaunt et al. 1996, McBride et al. 2003). Στη φυσική μόλυνση όλες οι παραπάνω οδοί ενοφθαλμισμού είναι πιθανές και επομένως, ανιχνεύσιμος τίτλος των IgG αντισωμάτων ενδέχεται σε κάποιες περιπτώσεις να εμφανιστεί μετά την έναρξη των συμπτωμάτων στην οξεία ΜΕΣ (Mylonakis et al. 2010).

##### **5. Ποια είναι η διαγνωστική χρησιμότητα του τίτλου των IgM αντισωμάτων στην ΜΕΣ;**

Σε αντίθεση με την καλά τεκμηριωμένη διαγνωστική χρησιμότητα των IgG, ελάχιστες μελέτες έχουν αξιολογήσει μέχρι σήμερα εκείνη των IgM αντισωμάτων στην ΜΕΣ. Από τις πειραματικές αυτές μελέτες προκύπτει ότι μετά τη μόλυνση, σημειώνεται μικρή, συνήθως, αύξηση του τίτλου των IgM αντισωμάτων, ταυτόχρονα ή μετά τη διαπίστωση ανιχνεύσιμου τίτλου IgG αντισωμάτων (Weisinger et al. 1975, McBride et al. 2003). Στη συνέχεια όμως, η κινητική των IgM αντισωμάτων δεν μπορεί πλέον να προβλεφθεί (Weisinger et al. 1975). Συνεπώς, ο προσδιορισμός των τελευταίων δεν φαίνεται να υπερέχει ή να προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες σε σύγκριση με εκείνο των IgG και ως εκ τούτου, δεν μπορεί να προταθεί ως εξέταση ρουτίνας, τουλάχιστον επί του παρόντος (Harrus and Waner 2011).

##### **6. Ποια είναι η ερμηνεία του θετικού ορολογικού αποτελέσματος έναντι της *E. canis*;**

Το θετικό αποτέλεσμα συνήθως δηλώνει τη μόλυνση του σκύλου από την *E. canis* κατά το πρόσφατο ή το αώτερο παρελθόν (Harrus and Waner 2011). Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί, ότι το θετικό ορολογικό αποτέλεσμα, δεν υποδηλώνει απαραίτητα ενεργό μόλυνση, ούτε συσχετίζεται με την κλινική φάση της ΜΕΣ ή τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας (Waner et al. 2001, Neer et al. 2002, Hegarty et al. 2009). Ένας οροθετικός σκύλος, ενδέχεται α) να μην είναι πλέον μολυσμένος, αφού θα μπορούσε να έχει απαλλαγεί από τη μόλυνση με ή χωρίς τη θεραπεία, β) να βρίσκεται στη μακροχρόνια υποκλινική φάση της νόσου, ή γ) να είναι

μολυσμένος από άλλα είδη του γένους *Ehrlichia* (π.χ. *E. chaffeensis* ή *E. ewingii*) (ερώτηση 8). Σπανιότερα, το αποτέλεσμα της ορολογικής εξέτασης, μη εξαιρουμένης της IFA στις χαμηλές αραιώσεις, ενδέχεται να είναι ψευδώς θετικό (Suksawat et al. 2000, Waner et al. 2000). Ο κτηνίατρος θα πρέπει ως εκ τούτου, να γνωρίζει ότι ένα οροθετικό αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώνει ότι η μόλυνση από την *E. canis* είναι αυτή που ευθύνεται για τα συμπτώματα και τις εργαστηριακές μεταβολές στο συγκεκριμένο σκύλο. Η ερμηνεία του θετικού ορολογικού αποτελέσματος πρέπει να γίνεται πάντοτε σε συνδυασμό με την κλινική και εργαστηριακή (αιματολογική και βιοχημική) εικόνα του σκύλου (Hegarty et al. 2009).

##### **7. Ποια είναι η ερμηνεία του αρνητικού ορολογικού αποτελέσματος έναντι της *E. canis*;**

Κατά κανόνα, ένα αρνητικό αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι ο σκύλος δεν έχει μολυνθεί από την *E. canis*. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε (ερώτηση 4), στην οξεία ΜΕΣ η εκδήλωση των συμπτωμάτων (8-20 ημέρες μετά τη μόλυνση) ενδέχεται να προηγηθεί του ανιχνεύσιμου τίτλου (7-35 ημέρες μετά τη μόλυνση) αντισωμάτων (Waner et al. 2000, Mylonakis et al. 2010, Gaunt et al. 2010). Στις περιπτώσεις αυτές, εφόσον η κλινική εικόνα είναι συμβατή με τη νόσο, η λήψη και εξέταση ζεύγους ορών, σε μεσοδιάστημα 2-3 εβδομάδων (θετικοποίηση ενός αρνητικού ή τετραπλασιασμός ενός αρχικά μη διαγνωστικού [ $<1/100$ ] τίτλου), ή η διενέργεια PCR στο αίμα ή σε άλλους ιστούς (π.χ. σπλήνας, μυελός των οστών), μπορούν να επιβεβαιώσουν την διάγνωση (Harrus and Waner 2011). Αν και σπάνια, σκύλοι με μυελοκατασταλτική ΜΕΣ ενδέχεται να έχουν αρνητικό ή πολύ χαμηλό τίτλο αντισωμάτων (Weisinger et al. 1975). Τέλος, το οροαρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να δηλώνει τη χαμηλή διαγνωστική ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης ορολογικής μεθόδου, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί, μεταξύ των άλλων, στην αντιγονική διαφοροποίηση των στελεχών της *E. canis* μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών (Hegarty et al. 1997, Seaman et al. 2004). Αυτό σημαίνει, ότι η διαγνωστική ευαισθησία μιας ορολογικής μεθόδου σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, θα μπορούσε να αυξηθεί εφόσον χρησιμοποιηθεί αντιγόνο από στέλεχος της *E. canis* που επικρατεί στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (Aguirre et al. 2009).

### 8. Υπάρχουν στην Ελλάδα άλλοι μικροοργανισμοί που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικό ορολογικό αποτέλεσμα λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με την *E. canis*;

Ισχυρές διασταυρούμενες ορολογικές αντιδράσεις έχουν διαπιστωθεί μεταξύ της *E. canis* και άλλων ειδών *Ehrlichia* όπως η *E. chaffeensis*, η *E. ewingii* και η *E. ruminantium* (Neer et al. 2002, Little 2010, Harrus and Waner 2011). Ωστόσο, στην Ελλάδα δεν υφίσταται τέτοιο πρόβλημα επειδή οι παραπάνω μικροοργανισμοί όπως και οι κρόττωνες που τους μεταδίδουν (*Amblyomma americanum*, *A. hebraeum*, *Dermacentor variabilis*) πιθανότατα δεν υπάρχουν (Papadopoulos et al. 1996, Papazahariadou et al. 2003, Siarkou et al. 2007). Ασθενείς διασταυρούμενες ορολογικές αντιδράσεις έχουν διαπιστωθεί μεταξύ της *E. canis* και των *Neorickettsia helminthoeca* and *N. risticii* που επίσης δεν έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα (Harrus and Waner 2011). Μέτριας έντασης διασταυρούμενη αντίδραση ενδέχεται να παρατηρηθεί μεταξύ των *E. canis* και *A. phagocytophilum* (Waner et al. 1998), χωρίς όμως να προκαλείται διαγνωστική σύγχυση στην κλινική πράξη (Chandrashekar et al. 2010). Επισημαίνεται ότι δεν υπάρχει διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ της *E. canis* και των *A. platys*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* και *Leishmania infantum* (Ristic et al. 1972, French and Harvey 1983, Guillen Llera et al. 2002, Mylonakis et al. 2005, Oliveira et al. 2008, Gaunt et al. 2010).

### 9. Ποια είναι η πιο σωστή αντιμετώπιση των ασυμπτωματικών αλλά οροθετικών στην *E. canis* σκύλων;

Σε χώρες που ενδημεί η ΜΕΣ όπως η Ελλάδα, η λήψη της ορθότερης απόφασης δεν είναι πάντοτε εύκολη (Εικόνα 1). Εφόσον υπάρχει η δυνατότητα διενέργειας αξιόπιστης PCR, το θετικό της αποτέλεσμα υποδηλώνει ενεργό μόλυνση οπότε θα πρέπει να γίνει θεραπεία. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος, κατά προτίμηση σε συνδυασμό ιστών (αίμα, μυελός των οστών, σπλήνας), η θεραπεία δεν δικαιολογείται (Harrus et al. 1998). Όταν όμως δεν υπάρχει η δυνατότητα πραγματοποίησης PCR, η απόφαση λαμβάνεται κατά περίπτωση. Στην περίπτωση σκύλου με θρομβοκυτταροπενία ή/και υπερσφαιριναιμία που δεν οφείλονται σε άλλα αίτια (π.χ. ψευδής θρομβοκυτταρο-

πενία, λείσμανίωση) συστήνεται η ανάληψη θεραπείας (Hegarty et al. 2009). Όταν απουσιάζουν τα σχετικά εργαστηριακά ευρήματα, οι συγγραφείς δεν συστήνουν την ανάληψη θεραπείας αλλά την περιοδική (ύστερα από 2-3 εβδομάδες [ζεύγος ορών] και στη συνέχεια κάθε 6-12 μήνες) ορολογική και αιματολογική εξέταση του ζώου. Στην περίπτωση αυτή, ο τετραπλασιασμός του τίτλου ή/και η εμφάνιση συμβατών αιματολογικών διαταραχών δικαιολογούν τη χορήγηση θεραπείας (Neer et al. 2002, Hegarty et al. 2009). Σημειώνεται, ότι η ανεύρεση των μοριδίων της *E. canis* στα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα του αίματος ή άλλων ιστών (π.χ. λεμφογάγγλια), επιβεβαιώνει την μόλυνση. Ωστόσο, η διαγνωστική ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης είναι πολύ χαμηλή σε σκύλους χωρίς κλινικά συμπτώματα (Mylonakis et al. 2003).

### 10. Πόσο χρήσιμες είναι οι ορολογικές εξετάσεις στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας έναντι της ΜΕΣ;

Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, στους περισσότερους σκύλους διαπιστώνεται προοδευτικά φθίνουσα πορεία του τίτλου των IgG αντισωμάτων, που ενδέχεται να καταστεί μη ανιχνεύσιμος σε διάστημα 6-9 μηνών (Neer and Harrus 2006). Ωστόσο, η πορεία του τίτλου εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το επίπεδο του κατά την έναρξη της θεραπείας (οι υψηλότεροι τίτλοι πέφτουν βραδύτερα) με αποτέλεσμα σε πολλούς σκύλους να παραμένει υψηλός για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (3-5 έτη), χωρίς να μπορεί πάντα να εξακριβωθεί αν αυτό οφείλεται στην αποτυχία της θεραπευτικής αγωγής, την επανέκθεση του ζώου στην *E. canis* μετά το τέλος της, ή τη διαταραχή της ανοσοαπάντησης (Codner and Farris-Smith 1986, Perille and Matus 1991, Bartsch and Greene 1996). Συνεπώς, οι ορολογικές εξετάσεις δεν είναι κατάλληλες για την επιβεβαίωση της απαλλαγής από τον παθογόνο παράγοντα. Σε περίπτωση, πάντως, που χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό, συστήνεται η χρήση ποσοτικών και όχι ποιοτικών ή ημιποσοτικών μεθόδων. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας, εκτιμάται πιο αξιόπιστα με την κλινική, αιματολογική και βιοχημική παρακολούθηση του ζώου, σε συνδυασμό με την PCR (Harrus et al. 2004, Harrus and Waner 2011). Η αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων παρατηρείται 1-3 εβδομάδες από την έναρξη της θεραπείας, ενώ, η υπερσφαιριναιμία υποχωρεί στους επόμενους 6-9 μήνες (Neer et al. 2002). ■

## REFERENCES

- Aguirre E, Ayllon T, Sainz A, Amusatogui I, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Tesouro MA (2009) Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*. *Vet J* 182:301-305.
- Bartsch RC, Greene RT (1996) 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.
- Belanger M, Sorenson HL, France MK, Bowie MV, Burbet AF, Breitschwerdt EB, Alleman AR (2002) Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 40:3506-3508.
- Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI (1998) Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol* 36:2645-2651.
- Chandrashekar R, Mainville CA, Beall MJ, O'Connor T, Eberts MD, Alleman AR, Gaunt SD, Breitschwerdt EB (2010) Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am J Vet Res* 71:1443-1450.
- Codner EC, Farris-Smith LL (1986) Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 189:47-50.
- Cohn LA (2003) Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33:863-884.
- De Castro MB, Machado RZ, de Aquino LPCT, Alessi AC, Costa MT (2004) Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol* 119:73-86.
- Donatien A, Lestogard F (1935) Existence en Algérie d, une Rickettsia du chien. *Bull Soc Pathol Exot* 28:418-419.
- French TW, Harvey JW (1983) Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am J Vet Res* 44:2407-2411.
- Gaunt SD, Corstvet RE, Berry CM, Brennan B (1996) Isolation of *Ehrlichia canis* in dogs following subcutaneous inoculation. *J Clin Microbiol* 34:1429-1432.
- Gaunt SD, Beall MJ, Stillman BA, Diniz PPVP, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB (2010) Experimental infection and coinfection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites and Vectors* 3:33.
- Guillen Llera JL, Lopez Garcia ML, Martin Reinoso E, De Vivar Gonzalez R (2002) Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 109:185-190.
- Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H (1998) Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 36:73-76.
- Harrus S, Alleman AR, Bark H, Mahan SM, Waner T (2002) Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol* 86:361-368.
- Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S (2004) Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4488-4490.
- Harrus S, Waner T (2011) Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis: an overview. *Vet J* 187:292-296.
- Hegarty BC, Levy MG, Gager RF, Breitschwerdt EB (1997) Immunologic analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. *J Vet Diagn Invest* 9:32-38.
- Hegarty BC, Diniz PPVP, Bradley JM, Lorentzen L, Breitschwerdt EB (2009) Clinical relevance of annual screening using a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Snap 3Dx) for canine ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 45:118-124.
- Kommenou A, Mylonakis ME, Kouti V, Tentoma L, Leontides L, Skountzou E, Dessiris A, Koutinas AF, Ofri R (2007) Ocular manifestations of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Vet Ophthalmol* 10:137-142.
- Kontos VI, Papadopoulos O, French TW (1991) Natural and experimental infection with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet Clin Pathol* 20:101-105.
- Koutinas A, Kontos V, Zaganidou D (1989) Canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A study of clinical cases and an experimental induction of the disease in the dog. *Bull Hel Vet Med Soc* 40:167-179.
- Little SE (2010) Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40:1121-1140.
- McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Bourdraux C, Guedry T, Walker DH (2003) Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect Immun* 71:2516-2524.
- Mylonakis ME, Billinis C, Koutinas AF (2001) An update on canine ehrlichiosis. *Bull Hel Vet Med Soc* 52:176-186.
- Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, 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. *Vet Microbiol* 91:197-204.
- Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VI (2004) Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 40:174-184.
- Mylonakis ME, Leontides L, Gonen L, Billinis C, Koutinas AF, Baneth G (2005) Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 129:229-33.
- Mylonakis ME, Kritsepi-Konstantinou M, Dumler JS, Diniz PPVP, Day MJ, Siarkou VI, Breitschwerdt EB, Psychas V, Petanides T, Koutinas AF (2010) Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J Vet Intern Med* 24:633-638.
- Mylonakis ME, Ceron JJ, Leontides L, Siarkou VI, Martinez S, Tvarijonavičiute A, Koutinas AF, Harrus S (2011) Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *J Vet Intern Med* 25:811-817.
- Neer TM, Breitschwerdt EB, Green RT, Lappin MR (2002) Consensus statement on ehrlichial diseases of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med* 16:309-315.
- Neer TM, Harrus S (2006) Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: Green CE (ed). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. Saunders Elsevier, St Louis, pp 203-216.



- O'Connor T, Hanscom JL, Hegarty BC, Groat RG, Breitschwerdt EB (2006) Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *Am J Vet Res* 67:206-210.
- Okewole EA, Adejimi JO (2009) Comparison of two clinic-based immunoassays with the immunofluorescence antibody test for the field diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56:145-155.
- Oliveira TM, Furuta PI, de Carvalho D, Machado RZA (2008) A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet* 17:7-11.
- Papadopoulos B, Morel P C, Aeschlimann A (1996) Ticks of domestic animals in the Macedonia region of Greece. *Vet Parasitol* 63:25-40.
- Papazahariadou MG, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Papadopoulos EG, Leontides L (2003) Tick infestation of dogs in Thessaloniki, Northern Greece. *Med Vet Entomol* 17:110-13.
- Perille AL, Matus RE (1991) Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *J Vet Intern Med* 5:195-198.
- Ristic M, Huxsoll DL, Weisinger RM, Hildebrandt PK, Nyindo MBA (1972) Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect Immun* 6:226-231.
- Seaman RL, Kania SA, Hegarty BC, Legendre AM, Breitschwerdt EB (2004) Comparison of results for serologic testing and a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res* 65:1200-1203.
- Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF (2007) Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol* 125:304-312.
- Suksawat J, Hegarty BC, Breitschwerdt EB (2000) Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 14:50-55.
- Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A (1997) Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol* 69:307-317.
- Waner T, Strenger C, Keysary A, Harrus S (1998) Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 66:237-243.
- Waner T, Strenger C, Keysary A (2000) Comparison of a clinic-based ELISA test with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. *J Vet Diagn Invest* 12:240-244.
- Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AWCA (2001) Significance of serologic testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol* 95:1-15.
- Weisinger RM, Ristic M, Huxsoll DL (1975) Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *Am J Vet Res* 36:689-694.