



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“CARACTERIZACIÓN DE LOS DAÑOS MACROSCÓPICOS Y
MICROSCÓPICOS DE ÓRGANOS PARENQUIMATOSOS OBTENIDOS
DE PERROS INFECTADOS POR *Ehrlichia canis*: REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA CUALITATIVA”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ELISA CAROLINA LÓPEZ GÓMEZ

ASESORES:

DR. PEDRO SÁNCHEZ APARICIO
DR. JOSÉ ANTONIO IBANCOVICH CAMARILLO
DR. CARLOS ARTURO RODRÍGUEZ ALARCÓN



Toluca, México Marzo de 2018

TÍTULO

CARACTERIZACIÓN DE LOS DAÑOS MACROSCÓPICOS Y
MICROSCÓPICOS DE ÓRGANOS PARENQUIMATOSOS OBTENIDOS DE
PERROS INFECTADOS POR *Ehrlichia canis*: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA
CUALITATIVA

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES Y HERMANOS.

Con mucha gratitud por una vida de constante apoyo, amor y esfuerzo para impulsar mi desenvolvimiento y enseñarme a creer en mis sueños los cuales me harían llegar a este punto tan importante de mi formación académica y en cada proyecto planteado, realizado y por realizar.

A MI ASESOR.

PEDRO SÁNCHEZ APARICIO, por su orientación constante y bien dirigida así como una crítica brillante y paciente para impulsarme a finalizar este proyecto tan ansiado.

A REVISORES.

JAVIER DEL ÁNGEL, por su valiosa aportación en el área clínica de pequeñas especies, para la finalización de este proyecto.

JOSÉ LUIS ZAMORA ESPINOZA, por su gran disposición para la valoración, análisis y crítica de este trabajo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
1. Ehrlichia canis en el mundo	3
1.1. Distribución de <i>Ehrlichia canis</i> en el mundo	3
1.2. Patogénesis de <i>Ehrlichia canis</i>	4
1.3 Signos clínicos provocados por la <i>Ehrlichia canis</i>	6
1.4. Diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i>	7
JUSTIFICACIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL Y MÉTODO	11
LÍMITE DE ESPACIO.....	13
LÍMITE DE TIEMPO.....	14
RESULTADOS.....	15
Capítulo 1. Ehrlichiosis.	15
1.1. Historia	15
1.2. Clasificación Taxonómica	16
1.3. Morfología	18
1.4. Distribución geográfica	18
Capítulo 2. Ehrlichia canis	20
2.1. Generalidades de Ehrlichia canis	20
2.2. Generalidades de los agentes rickettsiales.	21
2.3. Patogénesis	22
Capítulo 3. Cuadro Clínico Ehrlichia canis	30
3.1. Signos clínicos de la Ehrlichia canis	30
3.1.1 Fase aguda de la Ehrlichia canis.....	31
3.1.2. Fase subclínica de la Ehrlichia canis.....	34
3.1.3. Fase crónica de la <i>Ehrlichia canis</i>	35
Capítulo 4. Diagnóstico de la Ehrlichia canis	40

4.1. Diagnóstico de ehrlichiosis	40
4.1.1. Diagnóstico clínico	40
4.1.2. Diagnóstico de laboratorio.....	41
4.1.3. Hematología.....	42
4.1.4. Pruebas inmunológicas	45
4.1.5. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	45
4.1.6. Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)	46
4.1.7. Frotis sanguíneo	48
4.1.8. Cultivo.....	49
4.1.9. Serología.....	49
4.1.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50
Capítulo 5. Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos de animales infectados por Ehrlichia Canis	52
5.1 Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos ocasionados por Ehrlichia muris en ratón como modelo animal	52
5.1.1. Daños Microscópicos	52
5.1.2. Daños Macroscópicos	55
5.2 Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos ocasionados por ehrlichiosis monocítica humana	56
5.2.1. Daños Microscópicos	56
5.3 Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos de perros infectados por Ehrlichia Cani	62
5.3.1. Daños Microscópicos	62
5.3.2. Daños Macroscópicos	64
5.3.3. Daños en Bazo.....	67
5.3.4. Daños en Riñón	67
5.3.5 Daños en Pulmón.....	70
5.3.6. Daños en Cerebro.....	72
Capítulo 6. Tratamientos para Ehrlichia canis	74
6.1. Terapia antimicrobiana de ehrlichiosis canina	74
CONCLUSIÓN	76
SUGERENCIAS.....	79
LITERATURA CITADA.....	80

INDICE DE FIGURAS

NÚMERO	TITULO	PÁGINA
1	Clasificación Taxonómica <i>Ehrlichia cani</i>	17
2	Taxonomía de Dumler	17
3	Proceso de ingreso y liberación	24
4	Transmisión de <i>Ehrlichiosis canis</i>	25
5	Bazo de un perro con <i>Ehrlichiosis canis</i>	29
6	Avance de la patogenia por <i>Ehrlichiosis canis</i>	38
7	Signos clínicos representativos de Ehrlichiosis canina	39
8	Proliferación de hepatocitos	54
9	Hallazgos clínicos y hematológicos durante la fase aguda de la infección en ratones infectados con Ehrlichia muris-like agent (EMLA) IV	56
10	Examen microscópico de luz de las secciones de hígado teñidas con H&M	59
11	Manchas Ki-67	60
12	Hiperplasia de células Kupffer	61
13	Demostración inmunohistoquímica de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> en macrófagos hepáticos y células de Kupffer	62
14	Cambios histopatológicos en perros como resultado de infección	64
15	Ultrasonografía abdominal de enfermedades ocasionadas por garrapatas en perros	66
16	Cambios histopatológicos en perros como resultado de infecciones de <i>E. Canis</i>	67
17	Glomerulopatía membranoproliferativa en perros infectados naturalmente con <i>E. Canis</i>	69
18	Lesión glomerular en riñón de perros infectados naturalmente con <i>E. Canis</i>	69
19	Infiltrado inflamatorio en riñón de perros infectados naturalmente con <i>E. Canis</i> .	70
20	Fibrosis intersticial en riñón de perros infectados naturalmente con <i>E. Canis</i>	70
21	Cambios histopatológicos en perros como resultado de infecciones	71
22	Fotomicrografías de citología por aspiración de médula ósea (tinción de Hemacolor).	72
23	Fotomicrografía de citología del líquido cefalorraquídeo	73

ÍNDICE DE CUADROS

NÚMERO	TITULO	PÁGINA
1	Signos clínicos frecuentes <i>Ehrlichia canis</i>	30
2	Fase aguda <i>Ehrlichia canis</i>	33
3	Fase subclínica <i>Ehrlichia canis</i>	34
4	Patología y patogénesis de la lesión hepática HME	37
5	Fase Crónica Grave	38
6	Escala de clasificación de lesiones macroscópicas en órganos infectados de perros	63

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar los daños macroscópicos y microscópicos en órganos parenquimatosos ocasionados por *Ehrlichia canis* en perros, a través de la elaboración de una revisión bibliográfica de tipo cualitativa. Para lo cual resultó necesario actualizar la información ya existente sobre la ehrlichiosis canina, para de esta manera, poder identificar los diferentes métodos diagnósticos para iniciar el tratamiento lo más temprano posible con el antibiótico de primera elección y así evitar que la enfermedad evolucione.

El desarrollo y la evolución de esta patología adquiere importancia debido a su transmisión al ser humano, lo que ha derivado en un problema de salud pública. La ehrlichiosis canina es causada por el agente *Ehrlichia canis* y es transmitido por un vector artrópodo, *Rhipicephalus sanguineus*. La infección ocurre cuando la garrapata ingiere sangre de un animal infectado y ataca después a otro animal, ocasionando la transmisión del microorganismo vía mecánica. Posterior al período de incubación, presenta una fase aguda que oscila entre 2 a 4 semanas cuya multiplicación se suscita dentro de los monocitos; la fase subclínica puede durar hasta 5 años y los signos clínicos desaparecen, finalmente la fase crónica se caracteriza por aplasia medular ósea. El antibiótico de elección es la Doxiciclina, una tetraciclina semisintética, liposoluble, que se absorbe en el tracto digestivo, ésta se une a proteínas plasmáticas, penetra los tejidos y alcanza en la sangre concentraciones mayores respecto a otras tetraciclinas; además de su alta liposolubilidad, su eliminación renal es más lenta respecto a la oxitetraciclina, además que su grado de absorción es alto y su vida media en suero es de aproximadamente, 19.5 horas. Este compuesto actúa favoreciendo la fusión entre los fagosomas, donde se encuentran las ehrlichias y los lisosomas. Posee actividad bacteriostática y su tratamiento debe ser cuando menos durante 28 días. Se concluye que desde el punto de vista de la salud pública, la caracterización de los daños a nivel microscópico y macroscópico de órganos parenquimatosos de

perros infectados por *Ehrlichia canis* permite diagnosticar prontamente la patología y consecuentemente implementar el tratamiento adecuado, permitiendo la sobrevivencia del paciente canino y buena calidad de vida.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas son un problema emergente alrededor del mundo (Sarma *et al.*, 2014), sobre todo en climas tropicales y subtropicales, de éstas, varias especies de la Familia *Anaplasmataceae* pueden afectar al perro (Dumler *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2001), destacando la ehrliquiosis monocítica canina (EMC) que es causada por *Ehrlichia canis*. El principal vector de *Ehrlichia canis* en el perro es la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) (Shaw *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2012). Sin embargo, la garrapata del género *Amblyomma americanum* parece ser el principal vector de *E. ewingii* (Cohen *et al.*, 2010; Beall *et al.*, 2012). El diagnóstico de ésta enfermedad puede ser realizado al identificar directamente cuerpos de inclusión o mórulas en las células parasitadas (leucocitos o plaquetas, según sea el caso) de un frotis sanguíneo (Elias, 1992), o de aspirado de nódulos linfáticos (Mylonakis *et al.*, 2003); también se utiliza la detección específica de anticuerpos por medio de pruebas de inmunofluorescencia (IFA) o de ELISA-Dot (Cadman *et al.*, 1994) y por pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Kaewmongkol *et al.*, 2015; Nakaghi *et al.*, 2008; Movilla *et al.*, 2017). El diagnóstico en la fase crónica y la eficacia del tratamiento de la ehrliquiosis monocítica canina representa un reto para los veterinarios, porque existe la posibilidad de que las bacterias no se encuentren circulando en sangre en el momento de la obtención de la muestra. A la fecha, las enfermedades transmitidas por garrapatas son una amenaza para la salud de animales de compañía y para los seres humanos en el mundo (Jongejan y Uilenberg, 2004). Se sabe que esta enfermedad se distribuye en función al tipo de clima y a las áreas afectadas, destacando los climas tropicales y sub tropicales (Adrianzén *et al.*, 2003), aunque en los últimos años se ha reportado un aumento de casos en áreas con climas distintos a los citados. Dicha característica ocurre por el aumento de la temperatura ambiental, la cual es causada por el cambio climático e importación

de mascotas infestadas con este artrópodo (Dumler *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2001). Desde el punto de vista de la salud pública, resulta necesario caracterizar de manera certera los daños a nivel microscópico y macroscópico en órganos parenquimatosos de perros infectados por *Ehrlichia Canis* mediante la realización de una revisión de bibliografía de tipo cualitativa.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. *Ehrlichia canis* en el mundo

Las enfermedades transmitidas por garrapatas son un problema emergente alrededor del mundo, sobre todo en climas tropicales y subtropicales. De estas, varias especies de la Familia *Anaplasmataceae* pueden afectar al perro (Dumler *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2001). De entre ellas, está la ehrliquiosis *monocítica canina* (EMC) causada por *Ehrlichia canis*. Por otra parte, la ehrliquiosis granulocítica *canina* (EGC) y la anaplasmosis son causadas por la *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum*, respectivamente. Por último, la trombocitopenia cíclica canina (TCC) es causada por la infección de las plaquetas con *Anaplasma platys* (Cohn, 2003). Las características fenotípicas y biológicas de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son bastante similares, diferenciándose en su espectro de hospedadores y por las células que colonizan (Almazán *et al.*, 2016). Por este motivo, generalmente se describen las características generales del género *Ehrlichia/Anaplasma*. El principal vector de *Ehrlichia canis* en el perro es la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) (Shaw *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2012). Sin embargo, la garrapata del género *Amblyomma americanum* parece ser el principal vector de *E. ewingii* (Cohen *et al.*, 2010; Beall *et al.*, 2012). *Anaplasma phagocytophilum* es transmitida por garrapatas del género *Ixodes spp.* (Carrade *et al.*, 2011) y recientemente ha sido aislada de *Rhipicephalus sanguineus* (Ghafar y Amer, 2012).

1.1. Distribución de *Ehrlichia canis* en el mundo

Las enfermedades transmitidas por garrapatas siguen siendo una amenaza para la salud de animales de compañía (Sarma *et al.*, 2014) y para los seres humanos en el mundo (Jongejan y Uilenberg, 2004). Las áreas afectadas por este tipo de enfermedades son de climas tropicales y subtropicales (Adrianzén *et al.*, 2003), aunque en los últimos años se ha reportado un aumento de casos en áreas con

otros climas. Esto ocurre por el aumento de temperatura ambiental causado por el cambio climático y por la importación de mascotas infestadas con este artrópodo (Dumler *et al.*, 2001). La ehrlichiosis canina también es conocida como Rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi y pancitopenia tropical canina (Shaw *et al.*, 2001). La distribución de la ehrlichiosis está relacionada con la distribución del vector *Rhipicephalus sanguineus*, cuya incidencia ha sido documentada en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América. La incidencia de EMC está probablemente relacionada con la distribución geográfica de *Rhipicephalus sanguineus*, el vector primario de *E. Canis*. *Rhipicephalus sanguineus* no es una garrapata común en Japón, excepto en Okinawa. Por lo tanto, EMC es una enfermedad poco común en Japón y solo se ha informado en un perro que emigró de una zona endémica (Baba *et al.*, 2012). La ehrlichiosis monocítica canina es causada por la Rickettsia *Ehrlichia canis*, bacterias intracelulares obligadas gram negativas o cocoides pleomórficas pequeñas, las cuales son transmitidas por garrapatas que parasitan el citoplasma de los leucocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos) circulantes en grupos de organismos denominados mórulas (Waner y Harrus, 2000).

1.2. Patogénesis de *Ehrlichia canis*

Una gran variedad de factores como el tamaño de inóculo, cepa de *Ehrlichia*, inmunidad del paciente, enfermedades concomitantes producidas por otros parásitos transmitidos por garrapatas pueden influir en el curso y el resultado de la infección. El perro se infecta por la picadura de una garrapata que al alimentarse inyecta en el lugar secreciones salivares contaminadas con *Ehrlichia canis* o en forma iatrogénica por medio de transfusiones sanguíneas de un perro infectado a otro susceptible (Harrus *et al.*, 2007). La patogénesis de la ehrlichiosis canina incluye un período de incubación de 8 a 20 días, seguido de una fase aguda, subclínica y a veces crónica. Durante la fase aguda, el parásito ingresa al torrente

sanguíneo y linfático y se localiza en los macrófagos del sistema retículo-endotelial del bazo, hígado y ganglios linfáticos, donde se replica por fisión binaria. Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan a las rickettsias hacia otros órganos del cuerpo (Sainz *et al.*, 2000). La fase aguda puede durar entre 2 y 4 semanas. Los perros tratados inadecuadamente o no tratados, pueden desarrollar una fase subclínica que aunque sin signos clínicos de la enfermedad mantiene recuentos bajos de plaquetas (Reardon y Pierce, 1981). Estos pacientes se transforman en portadores sanos por un período que puede llegar hasta los 3 años. Durante el curso de la enfermedad, ocurren recombinaciones repetidas en los genes antigénicos proteicos principales de la membrana externa de ehrlichias, que conduce a la generación de variaciones en epítopes inmunogénicos y permite que los microorganismos evadan los mecanismos de defensa del huésped y den como resultado infecciones persistentes. En los pacientes con fase crónica de la enfermedad, en su forma más grave, el cuadro se caracteriza por la reducción de la producción de elementos sanguíneos de la médula ósea (Mylonakis *et al.*, 2004).

Diferentes mecanismos inmunológicos intervienen en la patogénesis de la enfermedad, entre los días 4 y 7 posteriores a la infección aparece IgM e IgA, y la IgG aumenta a partir del día 15, esta respuesta humoral tiene un efecto mínimo en la eliminación del organismo intracelular y no proporcionan protección ante una nueva infección, en cambio produce efectos perjudiciales en el progreso de la enfermedad debido a las consecuencias inmunopatológicas (McBride *et al.*, 2001). Esto se evidencia por pruebas de Coombs y de autoaglutinación positivas en animales infectados y la demostración de anticuerpos antiplaquetas (APA), lo cual parece ser una de las causas de la trombocitopenia o trombocitopatía (Villanueva, 2014).

1.3 Signos clínicos provocados por la *Ehrlichia canis*

A la fecha se han descrito signos clínicos muy diversos, esto puede ser debido a cuestiones multifactoriales, incluyendo diferencias en la patogenicidad de las diferentes cepas de *Ehrlichia*, raza de perros, infecciones concomitantes con otras enfermedades transmitidas por garrapatas y el estado inmunitario del perro. En la fase aguda, que puede durar entre 1 y 2 semanas los signos pueden incluir: depresión, letargia, anorexia, fiebre, linfadenomegalia, esplenomegalia y pérdida moderada de peso. Los perros pueden presentar tendencia al sangrado, petequias con equimosis en la piel, membranas mucosas y ocasionalmente epistaxis (Reardon y Pierce, 1981).

Los signos oculares son frecuentes e incluyen uveítis, hipema, tortuosidad de vasos retinales y lesiones corio-retinales focales. Puede haber desprendimiento de retina y ceguera debido a hemorragias subretinales. También pueden presentarse el vómito, descarga oculonasal serosa a purulenta, claudicación, ataxia e incluso disnea. En la enfermedad crónica, los signos clínicos más comunes son debilidad, depresión, anorexia, pérdida repentina de peso, palidez de mucosas, fiebre y edema periférico (especialmente en miembros posteriores y escroto) (Mylonakis *et al.*, 2004). Otros hallazgos frecuentes son el sangrado por trombopatía, petequias, equimosis dérmicas y de membranas mucosas y epistaxis. Parmar *et al.* (2012) realizaron diagnóstico de ehrlichiosis canina en 40 perros con signos asociados a la *E. Cani*, señalaron que los signos más comunes asociados a esta enfermedad fueron fiebre, depresión, anorexia y anemia, con tendencia al sangrado. En casos severos, el paciente muere a causa de las infecciones bacterianas secundarias o hemorragias incontrolables (Berelli y Walker, 2015).

Respecto a los signos neurológicos, pueden ocurrir tanto en la enfermedad aguda como crónica, estos pueden deberse a hemorragias, infiltración celular extensa y compresión perivascular de las meninges (Lewis, 2012). En ocasiones, se ha reportado la aparición de signos neuromusculares generalizados como polimiositis con tetraparesia progresiva de aparición aguda, hiporeflexia y consunción

muscular. En pacientes caninos, es posible la presencia de claudicaciones con andar endurecido por la poliartropatía, la cual puede ser producida por hemorragias en la articulación o por deposición de complejos inmunes con artritis y efusión neutrofílica en la articulación. Desde el punto de vista hematológico, la trombocitopenia es el hallazgo más común (Breitschwerdt, 2007), también la leucopenia y anemia moderada (normocítica, normocrómica no regenerativa).

1.4. Diagnóstico de *Ehrlichia canis*

El diagnóstico de estas enfermedades puede ser realizado al identificar directamente cuerpos de inclusión o mórulas en las células parasitadas (leucocitos o plaquetas) de un frotis sanguíneo (Elias, 1992), o de aspirado de nódulos linfáticos (Mylonakis *et al.*, 2003). También se utiliza la detección específica de anticuerpos por medio de pruebas de inmunofluorescencia (IFA) o de Dot-ELISA (Cadman *et al.*, 1994) y por pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (Nakaghi *et al.*, 2008). El diagnóstico en la fase crónica y la eficacia del tratamiento de la ehrliquiosis monocítica canina y la anaplasmosis canina representan un reto para los veterinarios, porque en ambos casos existe la posibilidad de que las bacterias no se encuentren circulando en sangre en el momento de la obtención de la muestra para desarrollar el diagnóstico.

Desde el punto de vista bioquímico, las principales anormalidades en los perros infectados son la hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia (Berelli *et al.*, 2015).

En frotis sanguíneos o aspirados de bazo teñidos con Giemsa puede confirmarse la infección por la visualización de las mórulas en los monocitos, pero solo aparecen en el 4% de pacientes enfermos (Waner y Harrus, 2000). Por lo cual, no debe ser el método de elección. No obstante, existe evidencia de que es posible se pueda ampliar la sensibilidad de esta técnica mediante la realización de frotis de capa flogística o frotis de sangre obtenida de capitales del margen de pabellón auricular. La trombocitopenia sobreviene experimentalmente a los 14 días de la

infección y es debida a una disminución de la vida media de las plaquetas (Elias, 1992). La causa del incremento de destrucción plaquetaria no se conoce, pero se piensa que existen fenómenos inmunes que también provocarían un defecto de agregación de plaquetas con la consiguiente diátesis hemorrágica, traducido clínicamente por epistaxis, púrpuras, petequias, visibles en mucosas y áreas provistas de pelo, zona abdominal, zona inguinal, etc (Walker, 2009).

Actualmente, la prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA) usando antígenos de *Ehrlichia canis* es el test serológico de diagnóstico más aceptable (Cadman *et al.*, 1994). Pueden detectar enfermos a partir de los 7 días después de la infección inicial, a pesar de que es posible que algunos perros no se tornen seropositivos hasta los 28 días después de la infección inicial. Con lo cual, luego de un diagnóstico negativo deben repetirse el examen a la 2 o 3 semanas. Después del tratamiento los anticuerpos declinan gradualmente y se tornan negativos entre los 6 y 9 meses, aunque algunos perros mantienen los niveles de anticuerpos altos de por vida, sin saber si el microorganismo persiste en el organismo por lo que se supone que el paciente se ha recuperado de la infección cuando resuelve la trombocitopenia, la hiperglobulinemia y otras anormalidades clínicas y de laboratorio de forma progresiva (Berelli *et al.*, 2015). Independientemente de las pruebas más actuales, Sarma *et al.* (2014) sugieren que se realicen exámenes de laboratorio a fin de coadyuvar en la detección de las enfermedades asociadas a *E. Canis* y el grado de afectación de los órganos parenquimatosos (Sarma *et al.*, 2014)

JUSTIFICACIÓN

La *Ehrlichia canis* en perros durante el desarrollo de su fase crónica ocasiona que ciertas bacterias puedan alojarse en órganos parenquimatosos, nódulos linfáticos e incluso a nivel de la médula ósea. Actualmente existen diversos tratamientos, destacando la administración de doxiciclina durante 30 días. Sin embargo, aún existe duda en la eficacia del tratamiento en esta especie animal. En áreas endémicas, los médicos veterinarios utilizan como herramientas de diagnóstico, las pruebas comerciales de ELISA conocida como IDEXX SNAP, las cuales han arrojado resultados variables en diferentes etapas de la enfermedad. La utilización de otras técnicas, como herramientas de diagnóstico; la PCR por punción por aguja fina (PAF) en biopsias de los órganos parenquimatosos de los animales infectados han dado resultados con menor variabilidad. Debido a lo anteriormente mencionado, se requiere encontrar la manera más efectiva de diagnosticar la patología en sus fases crónicas, detectar si el paciente sigue siendo portador sin presentar signología, además de determinar la eficacia de la posología con doxiciclina para la erradicación de la enfermedad en el perro infectado. Es por eso, que se han realizado redes temáticas de colaboración interinstitucional para proponer métodos de diagnóstico para la detección de *Ehrlichia* crónica, es decir, la utilización de biopsias de órganos de perros infectados, posteriormente realizar PCR-PAF. No obstante, para lograr esta meta, fue necesario realizar una revisión de bibliográfica de tipo cualitativa, para caracterizar los daños macroscópicos y microscópicos de órganos parenquimatosos en perros infectados por *Ehrlichia canis*.

OBJETIVOS

General

Caracterizar los daños en órganos parenquimatosos ocasionados por *Ehrlichia canis* en perros, a través de la elaboración de una revisión bibliográfica de tipo cualitativa.

MATERIAL Y MÉTODO

- **Material Para Consulta**

Base de Datos (PubMed, Medline, Redalib y Scopus)

Artículos científicos.

Normas Oficiales Mexicanas.

Internet

Software Microsoft Office Excel, Word

Programa Estadístico

Materiales de consulta

Metodología para desarrollo de revisión bibliográfica cualitativa

Se realizó una búsqueda en PubMed (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, Biblioteca Nacional de Estados Unidos, Bethesda, MD), Web of science (Thomson Reuters) y SCOPUS (Elsevier Inteligencia Investigación) desde su creación el 26 de mayo de 2015 y hasta la fecha. En la revisión se incluyeron estudios descriptivos y experimentales, además de estudios de tipo transversal y longitudinal sobre la patogenia de la *Ehrlichia Canis* en perros infectados naturalmente o *in vitro*.

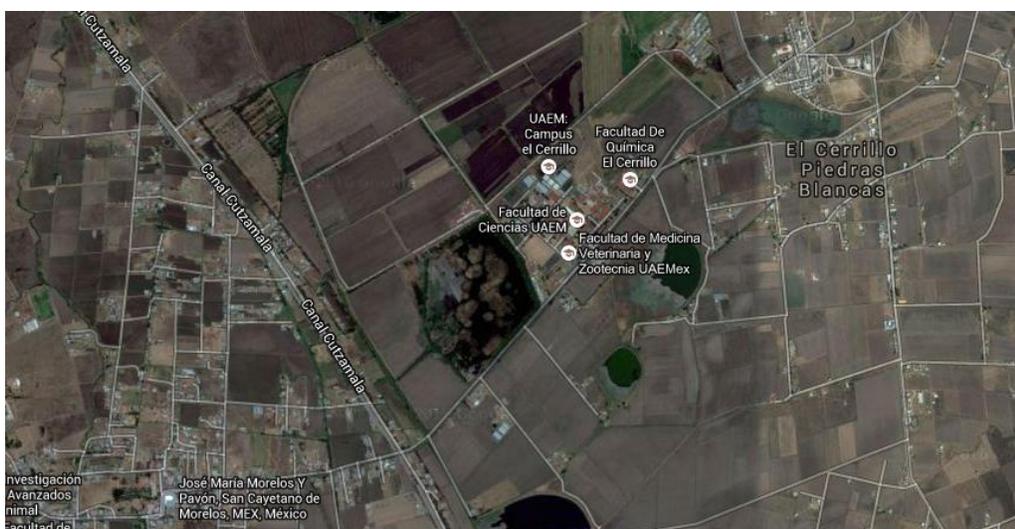
El resultado de la búsqueda, permitió obtener una determinada cantidad de estudios, de los cuales se realizó una selección de las investigaciones enfocadas específicamente a evaluar los daños microscópicos y macroscópicos de órganos parenquimatosos de perros, humanos y rata infectados con *Ehrlichia Canis*. Los documentos obtenidos fueron el resultado de una revisión y análisis de los títulos, y se eliminaron manuscritos duplicados y aquellos estudios que tenían como objetivo el tratamiento de la patología.

Para el análisis de la información se utilizó la técnica de investigación documental Carlos Bosch, (2008) la cual consistió en realizar la recolección de la información, selección, organización, vaciado y redacción, presentando la información en

Capítulos (Ehrlichiosis, historia de la enfermedad, clasificación taxonómica, morfología, distribución geográfica, generalidades, patogénesis, cuadro clínico de la *Ehrlichia canis*, signos clínicos, fase aguda, fase subclínica, fase crónica, fase crónica grave, diagnóstico, diagnóstico clínico, diagnóstico de laboratorio, hematología, pruebas inmunológicas, inmunodeficiencia indirecta, inmunoabsorbancia ligada a enzimas por ELISA, frotis sanguíneo, cultivo, serología, tratamiento), los documentos organizados fueron clasificados por fecha, cada uno para extraer lo más relevante de lo investigado por cada autor (es).

LÍMITE DE ESPACIO

La presente revisión sistemática, se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México ubicado en el cerrillo piedras blancas, municipio de Toluca, Estado de México a una latitud norte de 19° 17' 29" de latitud norte y a los 99° 39' 38" de longitud oeste.



LÍMITE DE TIEMPO

Cronograma de actividades

Actividades por realizar	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Identificación y manejo de las bases de datos para la identificación de literatura primaria.	X					
Elaboración de palabras clave.	X					
Compilación de información de carácter científico.	X					
Clasificación de la información.		X				
Análisis de la información.		X	X			
Redacción de la tesina.			X	X		
Trámites en el departamento de titulación de la FMVZ.				X	X	
Trámites de autorización de examen ante los H.H. Consejos Académico y de Gobierno.					X	
Obtención del título.						X

RESULTADOS

Capítulo 1. Ehrlichiosis.

1.1. Historia

El primer agente etiológico de ehrlichia fue identificado en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935, quienes identificaron un microorganismo rickettsial en monocitos de caninos infestados por garrapatas que presentaban un cuadro patológico caracterizado por fiebre, anemia, además de pancitopenia severa. El agente causal fue denominado *Rickettsia canis* (Sainz *et al.*, 2000), y en 1945 nombrado *Ehrlichia canis*, en alusión al bacteriólogo Paul Ehrlich (Dumler *et al.*, 2001, López *et al.*, 2003). En 1962, en Estados Unidos, la *E. Canis* fue reconocida y a finales de la misma década, se definió el rol patogénico significativo de esta especie, cuando se estableció su participación etiológica en la enfermedad pancitopenia tropical canina (Murphy y Papasouliotis, 2012). Esta enfermedad infecciosa fue identificada en caballos y su causal está presente en neutrófilos y eosinófilos, se le nombro *Ehrlichia equi*, cuyo agente relacionado podía afectar los granulocitos de los perros (Madewell y Gribble, 1982). Una vez descrita la enfermedad en perros y con las técnicas moleculares aunadas al desarrollo de la genómica, esta bacteria se reclasificó como *A. phagocytophilum* y a la enfermedad que producía, anaplasmosis granulocítica canina, que fue reportada por primea vez en 1996 en los Estados Unidos en Minnesota y Wisconsin (Greig y Armstrong, 2006).

Las ehrlichiosis son un grupo de enfermedades de transmisión vectorial que pueden afectar a animales domésticos y salvajes, e incluso al hombre (Cohn, 2003). Los huéspedes vertebrados infectados incluyen al canino, coyote, zorro y chacal, mismos que se consideran reservorios. La ehrlichiosis monocítica canina es causada por la *Rickettsia Ehrlichia canis*, bacterias intracelulares gram negativas y cocoides pleomórficas pequeñas, las cuales son transmitidas por garrapatas que parasitan el citoplasma de los leucocitos (monocitos, macrófagos y

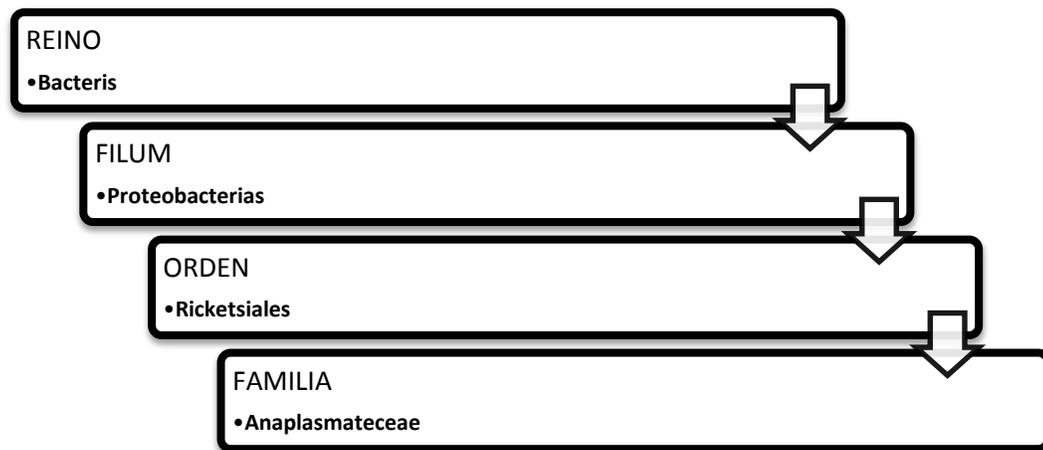
granulocitos) circulantes en grupos de organismos denominados mórulas. Ehrlichiosis es una enfermedad que no presenta ninguna afinidad por sexo, aunque se ha descrito más sensibilidad a edad intermedia en la raza Pastor Alemán (Harrus *et al.*, 1997).

1.2. Clasificación Taxonómica

Dumler *et al.* (2001), realizaron una reorganización de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, los cuales habían sido clasificados previamente en función a sus características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas y clínicas. En la nueva clasificación taxonómica adicionaron análisis genéticos basados en la similitud del ARN ribosómico, del *groESL heat shock operon* y de genes que codifican proteínas de superficie. La familia *Anaplasmataceae* fue el resultado de esta clasificación, la cual estuvo dividida en tres genogrupos o géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* cuyos miembros generalmente producen una elevada reacción antigénica cruzada entre especies de un mismo genogrupo (Cohn, 2003). Estas especies quedaron clasificadas dentro del Reino bacteris, filum Proteobacterias, orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae* y las diferentes especies quedaron incluidas en los siguientes géneros:

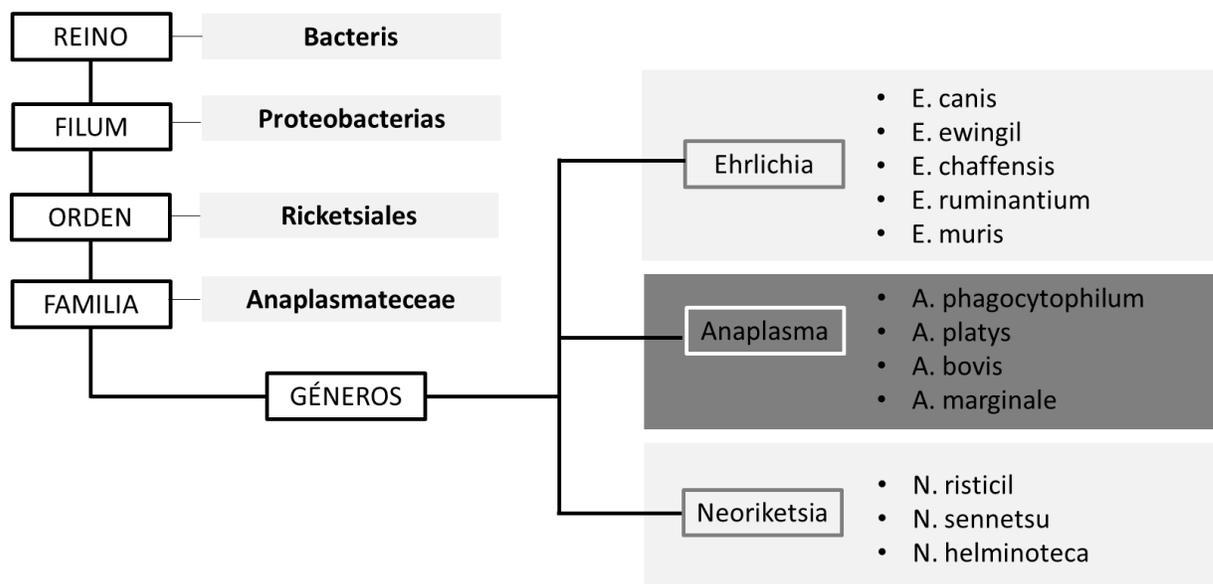
- a) Género *Ehrlichia*: incluye las especies *E. Canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium* y *E. muris*.
- b) Género *Anaplasma*: incluye *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis* y *A. marginale*.
- c) Género *Neorickettsia*: incluye a *N. risticii*, *N. sennetsu* y *N. helmintoeca*.

Figura 1 Clasificación Taxonómica *Ehrlichia canis*



En la figura 2, se observa la clasificación taxonómica de Dumler, originalmente reportada por Chávez Calderón (2014), la cual fue adaptada a las condiciones más recientes.

Figura 2. Taxonomía de Dumler



1.3. Morfología

El *A. phagocytophilum* es un coco gram negativo envuelto por una doble membrana, su tamaño varía desde 0.4 μm hasta 2 μm . La membrana externa de la bacteria es rugosa con un espacio periplásmico irregular, además de presentar ribosomas y finas cadenas de ADN dentro de las bacterias (Rikisha, 1997).

1.4. Distribución geográfica

Las enfermedades transmitidas por garrapatas siguen siendo una amenaza para la salud de animales de compañía (Sarma *et al.*, 2014) y para los seres humanos en el mundo (Jongejan y Uilenberg, 2004). Estos agentes bacterianos requieren para su transmisión de la participación de vectores: garrapatas en el caso de *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.* y tremátodos en el caso de *Neorickettsia spp.* (Neer y Harrus 2006). Esta transmisión vectorial hace que la prevalencia de la infección por cada agente dependa de la distribución geográfica de su vector (Hinrichsen *et al.*, 2001).

Las áreas afectadas por este tipo de enfermedades son de climas tropicales y subtropicales (Adrianzén *et al.*, 2003), aunque en los últimos años se han reportado un aumento de casos en áreas con otros climas. Esto ocurre por el aumento de la temperatura causado por el cambio climático y por la importación de mascotas infestadas con este artrópodo (Dumler *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2001). La ehrlichiosis canina también es conocida como Rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi y pancitopenia tropical canina. La distribución de la ehrlichiosis está relacionada con la distribución del vector *Rhipicephalus sanguineus*, se ha descrito su ocurrencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América (Baneth, 2006) y más recientemente casos aislados en Japón (Baba *et al.*, 2012)

En los últimos años se han identificado gran diversidad de estudios que demuestran evidencia serológica en América (Costa Rica, Estados Unidos de

América, Chile y México) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2004); Perú (Chavera *et al.*, 1982), Cuba (León *et al.*, 2008), Nicaragua (Rivas *et al.*, 2010), Venezuela (Quijada *et al.*, 2012), Colombia (Carrillo *et al.*, 2012), Argentina (Eiras *et al.*, 2013), y evidencia molecular en: Costa Rica, Venezuela, EEUU, Brasil y México (Romero *et al.*, 2011).

Capítulo 2. *Ehrlichia canis*

2.1. Generalidades de *Ehrlichia canis*

Inicialmente, la etiología de este proceso fue confusa ya que recibió diversos nombres, como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi y pancitopenia tropical canina (Waner y Harrus, 2000). A finales de la década de los 70s, se confirmó que el agente causal de aquella patología era *E. Canis* (Huxsoll *et al.*, 1969) y que existía una diferencia en el agente causal entre los perros y humanos. A finales de los años 80 se indicó que la infección por *E. Canis* en el hombre, era causada por *E. chaffeensis* (Neer y Harrus, 2006). *E. Canis* puede infectar al perro y miembros de la familia Canidae, como coyotes, lobos, zorros y chacales (Stiles, 2000). La infección de tipo crónica afecta a estos animales desde los 2 meses y hasta los 14 años, produciendo daños multisistémicos importantes, afecta al sistema hematopoyético, linfoide, hepático, renal, articular u ocular. Recientemente (Aguirre *et al.*, 2009; Ayllón *et al.*, 2009) sugirieron que *E. Canis* u otra especie estrechamente relacionada podría ser capaz de infectar al gato e incluso al hombre.

Inicialmente las especies ehrlichiales se dividían en tres clases, basándose en las "células blanco" que infectaban, teniendo especies monocíticas, granulocíticas y trombocíticas. Algunas de ellas pueden infectar más de un tipo celular (Neer, 2000). Ehrlichiosis monocitotrópica canina (EMC) se refiere a la enfermedad causada por el organismo intracelular *E. Canis* debido a su tropismo por las células monocíticas, se caracteriza por ser una bacteria "pequeña", cocoide, gram negativa, intracelular obligada y pleomórfica que parasitan las células sanguíneas circulantes de hospedadores mamíferos susceptibles (Rikihisa, 1991). La bacteria se presenta en forma intracitoplasmática e infecta principalmente a monocitos y macrófagos formando grupos llamadas mórulas (Dumler *et al.*, 2001). Las mórulas

intracelulares de *E. Canis* se pueden observar en los leucocitos caninos especialmente en aquellos animales que presentan fiebre como signo clínico, trombocitopenia, leucopenia, anemia, linfadenopatía, esplenomegalia y/o pérdida de peso (Fermin, 2008; Walker, 2009). Las mórulas de ehrlichia presentan una forma redonda oval y una coloración eosinofílica a basófila. Las mórulas de *E. Canis* se localizan en el citoplasma de los linfocitos y monocitos, pudiendo observarse en la fase aguda de la infección (Fermin, 2008).

El vector de la *E. Canis*, es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, probablemente la más distribuida en el mundo (Baba *et al.*, 2012), aunque experimentalmente también *Dermacentor variabilis* puede transmitir a *E. Canis* (Johnson *et al.*, 1998). El *R. sanguineus* se infecta al ingerir sangre de un animal infectado durante las primeras 2-3 semanas posteriores a la infección, ya que en este período existe un mayor número de leucocitos con *E. Canis* en la sangre circulante (Woody y Hoskins, 1991; Chávez-Calderón, 2014). Las *E. Canis* llegan al epitelio intestinal y penetran en la cavidad corporal de la garrapata (el hemocele) acompañados del agua y de los iones en exceso que son aprovechados por las glándulas salivares para formar la saliva que será de nuevo inoculada, en ese o en otro hospedador, permitiendo la transmisión de los agentes infecciosos ingeridos con su comida (Cupp, 1991).

2.2. Generalidades de los agentes rickettsiales.

Los microorganismos rickettsiales pertenecen al Reino Proteobacteria, clasificados como α -proteobacterias, gram negativas, grupo que incluye un gran número de agentes oligótrofos, los cuales son capaces de crecer en niveles bajos de nutrientes. Dentro de este Reino se encuentran otros géneros como *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Vibrio* (Prescott *et al.*, 1999). Las rickettsias causantes de ehrlichiosis y anaplasmosis se clasifican como bacterias dentro del grupo α -proteobacteria, todos ellos considerados organismos

intracelulares obligados que utilizan oxígeno y poseen enzimas metabólicas (Harrus *et al.*, 2007).

El género ehrlichia, pertenece a las bacterias gramnegativas, intracelular obligada transmitidas por la garrapata, infectan principalmente a los leucocitos (Breitschwerdt, 2007; Harrus *et al.*, 2007). La morfología de estos microorganismos presentan formas bacilares, cocoides o pleomórficas, presentando paredes típicas de bacterias gram negativas con ausencia de flagelos (Breitschwerdt, 2007), las formas cocoides se presentan aisladas en pares, cuyo diámetro reportado es de 0.3 a 0.5 μm con longitud de 0.8 a 2.0 μm (Prescott *et al.*, 1999).

2.3. Patogénesis

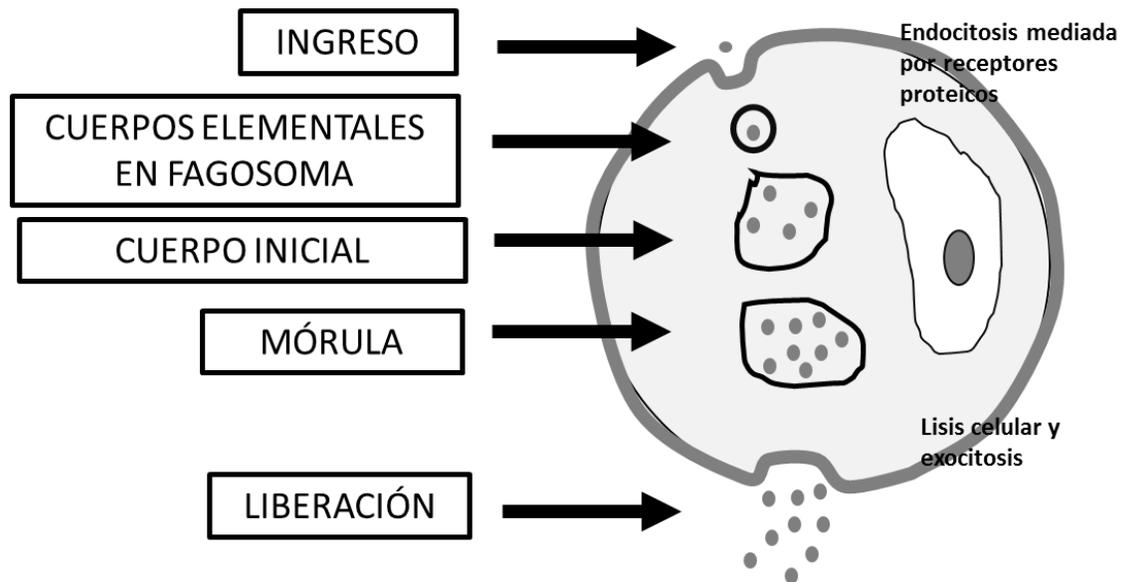
El período de incubación de la EMC puede variar en la infección natural entre 8 y 20 días (Hibler *et al.*, 1986; Sainz *et al.*, 2000; Harrus *et al.*, 2007), tras el que se describen clásicamente tres fases de la enfermedad: aguda, subclínica y crónica. Estas fases han sido descritas en las infecciones experimentales y, sin embargo, en la infección natural no son fácilmente distinguibles entre sí (Woody y Hoskins, 1991). La fase aguda puede durar de 1 a 4 semanas. Se conoce que la mayoría de los perros se recuperan de la enfermedad aguda siempre y cuando el tratamiento sea el adecuado. Los perros no tratados pueden recuperarse clínicamente, aunque posteriormente pueden entrar en la fase subclínica, donde solo el recuento de plaquetas puede ser inferior a la normal. Los perros en esta fase pueden estar “clínicamente sanos” durante meses e incluso años (Neer, 2000; Harrus *et al.*, 2007), de aquí la importancia de realizar un diagnóstico temprano, caracterizar los daños a nivel macro y micro para poder administrar un tratamiento adecuado.

La infección natural del hospedero, como lo es el perro, ocurre después de que una garrapata ha ingerido sangre de un animal infectado, la cual se fija a un

animal sano, posteriormente se alimenta de él ingiriendo su sangre, y con sus secreciones salivales contaminan el área de alimentación en el hospedero susceptible, ocasionando el pasaje del microorganismo vía mecánica. El microorganismo también se transfiere por transmisión iatrogénica mediante transfusiones sanguíneas de perros donadores infectados, siendo ésta última una vía muy poco frecuente (Neer, 2000; Neer y Harrus, 2006) sobre todo en países en vías de desarrollo, ya que de cada 100 pacientes que requieren incrementar su volumen plasmático, solo 5 de ellos son transfundidos.

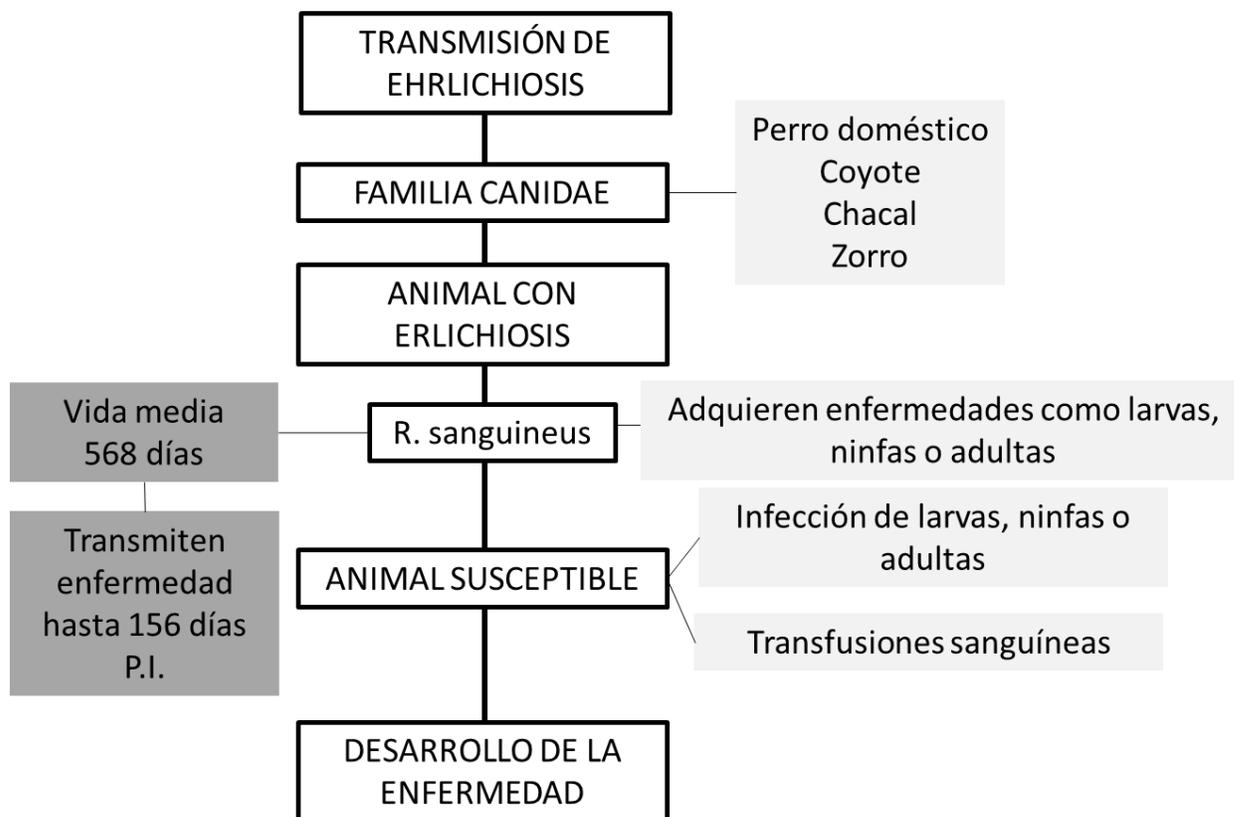
E. Canis se replica en las células mononucleares de nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea (Reardon y Pierce, 1981), en los que penetra por endocitosis mediada por receptores proteicos de la superficie celular (Messick y Rikihisa, 1993). En el interior de su célula diana, estos microorganismos inicialmente se desarrollan en forma de “cuerpos elementales”, cuyo diámetro es de 0,5-0,9 μm . Nyindo *et al.* (1971) reportaron que dichos microorganismos aumentan de tamaño, comienzan su replicación por fisión binaria y se agrupan, convirtiéndose en “cuerpos iniciales”, de 1,4-2 μm de diámetro, que continúan replicándose y agrupándose para dar lugar a las “mórulas” denominadas así por su forma típica, las cuales se caracterizan por ser colonias bacterianas rodeadas por una membrana vacuolar de un diámetro mayor a 2 μm . Los microorganismos se liberan de la célula hospedadora por lisis celular y exocitosis (Rikihisa, 1991). Las mórulas contienen 100 o más cuerpos de *Ehrlichia canis* (Baneth 2006). En la figura 3, se esquematiza una adaptación que se hizo a los estudios reportados por Chávez Calderón (2014), en los cuales se describe el proceso de ingreso y liberación de la *E. Canis*.

Figura 3. Proceso de ingreso y liberación de *E. Canis*



La infección de las garrapatas se transmite a las etapas posteriores, pero no en los huevos maternos de la siguiente generación. Las garrapatas adquieren *E. Canis*, ya sea como larvas o ninfas al alimentarse de perros contaminados y transmiten la infección durante al menos 155 días a partir de entonces a los perros susceptibles (Figura 3) (Harrus *et al.*, 2007). La capacidad de este patógeno, le permite pasar el invierno en la garrapata y en la siguiente primavera dicha garrapata podrá infectar y afectar a los perros susceptibles. La mayoría de los casos de ehrlichiosis se producen durante la temporada de verano, sin embargo, la enfermedad puede ocurrir durante todo el año como resultado del periodo subclínico prolongado en animales infectados crónicamente. Los perros que viven o viajan a regiones endémicas son candidatos para la enfermedad (Harrus *et al.*, 1998), de aquí es importante resaltar que se debe tener mucha precaución con los perros cuando son transportados como animales de compañía a zonas endémicas. La transmisión de la *Ehrlichiosis canina*, su susceptibilidad y el tiempo de desarrollo de dicha patología se observan en la figura 4.

Figura 4. Transmisión de *Ehrlichiosis canis*



Posterior al período de incubación, se observa la fase aguda, la cual tiene una duración de 2 a 4 semanas. En esta fase se multiplican los microorganismos en células mononucleares (macrófagos y linfocitos) por fisión binaria y se diseminan a la totalidad del cuerpo. Waner y Neer (2007), señalaron que ehrlichia se propaga entre las células a través de la salida y absorción de proyecciones citoplasmáticas adyacentes; la replicación en el huésped tiene lugar en vacuolas unidas a la membrana aisladas y protegidas por el sistema inmune del huésped, lisosomas y reactivos intermediados por el oxígeno. La ehrlichia puede ser liberada para infectar nuevas células, por ruptura de la membrana de la célula huésped en una etapa posterior de la formación de mórula. La replicación inicial es la misma que se da en leucocitos mononucleares circulantes, colonizan los órganos conformados por células de tipo mononuclear, tales como el bazo, hígado, médula

ósea y nódulos linfáticos donde generan hiperplasia con infiltración de células plasmáticas (Neer, 2000).

Los signos clínicos durante la fase aguda de la enfermedad son variables en función a la raza e incluso a la edad, destacan la depresión, anorexia, fiebre, pérdida intensa de resistencia, pérdida de peso, secreciones oculares y/o nasales, disnea, linfadenopatías y edema en extremidades e incluso escroto. Los signos clínicos de la fase aguda son transitorios y generalmente se resuelven en 1 a 2 semanas con ausencia de tratamiento. Habitualmente puede presentarse trombocitopenia y leucopenia de 10 a 20 días después de la infección (Breitschwerdt, 2007).

La fase subclínica se establece cuando el animal sobrevive a la fase aguda y se presenta de manera espontánea o por un tratamiento inefectivo. Se caracteriza por la persistencia del microorganismo y el alza en los títulos de anticuerpos. Tiene una duración promedio de 6 a 9 semanas (Neer, 2000; Harrus *et al.*, 2007), además se ha reportado que tiene la capacidad de permanecer por varios meses o años.

La persistencia del antígeno en las células infectadas obra como estímulo para el sistema inmune. Los títulos de anticuerpos se elevan grandemente en esta fase y los animales inmunocompetentes por lo general eliminan al microorganismo en esta etapa (Knowles *et al.*, 2003). Los pacientes que no eliminan la infección progresan hasta la fase crónica. Los signos clínicos están ausentes pero persisten los cambios hematológicos, principalmente la trombocitopenia. Esto indica que los cambios patológicos continúan, sólo que no son observados clínicamente. Como consecuencia de la infección se produce una respuesta inmune humoral importante que a menudo no es capaz de eliminar el agente patógeno (Sainz *et al.*, 2000).

Sin embargo, Harrus *et al.* (2007), reportaron que al igual que otras ehrlichias, *E. chaffeensis* carece de enzimas para la biosíntesis de peptidoglicano y lipopolisacáridos (LPS), que proporcionan resistencia a la membrana externa. La

ausencia de LPS y peptidoglicano también tienen implicaciones importantes para la infección y la supervivencia de los organismos de ehrlichia tanto en las garrapatas como en los huéspedes mamíferos. El sistema inmune de la garrapata es competente para responder a la presencia de LPS, y por lo tanto la ausencia de LPS en los organismos de ehrlichia les da un beneficio de supervivencia. En el huésped mamífero, macrófagos o neutrófilos utilizan receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo Toll-like, para unir moléculas con patrones moleculares asociados a patógenos conservados como LPS o peptidoglicano. Esta reacción provoca una intensa respuesta inmune innata destinada a eliminar a los microorganismos; por lo tanto, la ausencia de LPS y peptidoglicanos da a la *E. chaffeensis*, y otros organismos estrechamente relacionados a las rickettsias, una ventaja en la supervivencia intraleucocítica.

Se ha demostrado que el bazo y la médula ósea son los órganos parenquimatosos blancos más importantes para *E. Canis* en esta etapa de la enfermedad. La fase crónica de la enfermedad ocurre en los perros que no logran montar una respuesta inmune eficiente contra el microorganismo (Sainz *et al.*, 2000). En esta etapa de la enfermedad se pueden presentar cuadros leves, manifestando una enfermedad vaga con pérdida de peso y con alteraciones hematológicas moderadas. La forma grave se caracteriza por deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos que da por resultado pancitopenia. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del microorganismo, cuando hay una enfermedad concomitante en algunas razas de perros como el pastor alemán y en los animales jóvenes (Neer, 2000).

Los signos clínicos de la fase crónica se caracterizan por presencia de hemorragia, ictericia ocasionada por anemia, pérdida de peso corporal, debilidad muscular, dolor al momento de la exploración abdominal, uveítis anterior, hemorragias retinianas y signos neurológicos compatibles con meningoencefalitis tipifican los perros que desarrollan las manifestaciones de la enfermedad durante la infección crónica (Mylonakis *et al.*, 2004), así mismo existen infecciones

bacterianas coexistentes, especialmente en perros con neutropenia, donde pueden aparecer numerosos patrones de hemorragias (Breitschwerdt, 2007; Harrus *et al.*, 2007). Como resultado de la hipoplasia de la medula ósea puede haber presencia de pancitopenia severa, siendo un hallazgo típico de la enfermedad crónica. Algunos estudios han demostrado que los leucocitos y las plaquetas se encuentran significativamente más bajo del recuento normal. La leucopenia grave, anemia grave, prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y la hipocalcemia, pueden producir mortalidad con una probabilidad del 100%. Harrus *et al.* (2007), señalaron que la muerte puede ocurrir a consecuencia de hemorragias y/o infecciones secundarias. Los mismos autores señalan que la trombocitopenia corresponde a una anormalidad hematológica que es muy común en todas las fases de la enfermedad de aquellos perros infectados con *E. Canis*. Cuanto mayor es la magnitud de la trombocitopenia, mayor es la posibilidad para la detección de *E. Canis*. Algunos mecanismos involucrados en la patogénesis de la trombocitopenia incluyen aumento de consumo de plaquetas y disminución de su vida como resultado del secuestro esplénico y destrucción inmunomediada. Se han detectado anticuerpos circulantes unidos a plaquetas y anticuerpos antiplaquetarios en la sangre entera y suero, respectivamente, de perros en la fase aguda después de las infecciones naturales y artificiales siguientes con *E. Canis.*, además de una citoquina sérica que se comporta como factor de migración de inhibición de plaquetas (FMIP). La disminución de la producción de plaquetas se da como resultado de la medula ósea hipoplásica y se considera que es el mecanismo responsable de la trombocitopenia en la fase crónica. La disfunción plaquetaria junto con el bajo recuento de plaquetas contribuye a las hemorragias observadas en EMC (Harrus *et al.*, 2007; Walker, 2009).

Las alteraciones hematológicas compatibles con *E. Canis*, como anemia, neutropenia, trombocitopenia, linfocitosis, monocitosis y eosinofilia. La infección puede provocar disfunción neurológica y cojera que afecta a una o más

extremidades, rigidez muscular, una marcha afectada, renuencia a levantarse, espalda arqueada e hinchazón y dolor articular. A menudo se notifican poliartritis o meningoencefalitis, caracterizadas por una respuesta inflamatoria predominantemente neutrofilia y, generalmente, acompañadas de fiebre (Breitschwerdt, 2007).

Capítulo 3. Cuadro Clínico *Ehrlichia canis*

3.1. Signos clínicos de la *Ehrlichia canis*

La ehrlichiosis canina es una enfermedad que causa ehrlichiosis monocítica canina (CME), trastorno sistémico manifestado por fiebre, tendencias hemorrágicas asociadas con trombocitopenia y disfunción plaquetaria, además de anemia no regenerativa (Baba *et al.*, 2011) (cuadro 1). Parmar *et al.* (2012) realizaron diagnóstico de ehrlichiosis canina en 40 perros con signos asociados a la *E. Cani*, señalaron que los signos más comunes asociados a esta enfermedad fueron fiebre, depresión, anorexia y anemia, con tendencia al sangrado (Parmar *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Signos clínicos frecuentes *Ehrlichia canis*.

Signos clínicos	
SIGNOS OCASIONALES	
<ul style="list-style-type: none">• Linfadenomegalia• Esplenomegalia• Edema extremidades y escroto	
OTROS	
<ul style="list-style-type: none">• Secreción oculonasal• Palidez de mucosas	
NEUMONÍA INTERSTICIAL	TROMBOCITOPENIA
<ul style="list-style-type: none">• Disnea• Exudado oculonasal• Aumento sonidos respiratorios	<ul style="list-style-type: none">• Conjuntivitis• Opacidad corneal• Panuveítis• Hipema• Hemorragias retinianas• Desprendimiento de retina• Glaucoma

Una gran variedad de factores, incluso el tamaño del inóculo de *E. Canis*, pueden influir en el curso y el resultado de la infección. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del organismo. Un análisis de inmunotransferencia de respuesta de IgG a *E. Canis* ha mostrado que puede existir diversidad antigénica entre organismos de *E. Canis* de distintas partes del mundo y ha sugerido que este hecho puede afectar la gravedad de la enfermedad (Neer, 2000; Neer y Harrus, 2006).

La enfermedad concomitante con otros parásitos transmitidos por garrapatas u otros patógenos puede incrementar la gravedad y las manifestaciones de la enfermedad. En el caso de animales inmunodeficientes, es posible que desarrollen manifestaciones más graves y que muestren mórulas circulantes en exceso. No existe predilección de edad ni sexo en EMC. Un estudio realizado por Nyindo *et al.*, (1991) demuestra que los pastores alemanes son más susceptibles que otras razas, ya que la presencia de la enfermedad en esta raza es más grave y presenta un pronóstico desfavorable. Es posible que dicha susceptibilidad ocasionada por la raza pueda atribuirse a diferencias raciales en la habilidad para desarrollar respuestas inmunes humorales o celulares adecuadas. Incluso, se observa depresión de la respuesta inmune celular a la infección por *E. Canis* en Pastores alemanes respecto a los Beagle.

3.1.1 Fase aguda de la Ehrlichia canis

Después de la entrada y replicación en el interior de las células monocíticas de *E. Canis* se produce la fase aguda de la enfermedad, que consiste en la multiplicación y diseminación por la circulación sanguínea o linfática de las bacterias (Huxsoll *et al.*, 1970; Hibler *et al.*, 1986). Esta diseminación de *E. Canis* por el organismo le permite distribuirse por aquellos órganos parenquimatosos que presentan una población numerosa de fagocitos mononucleares, como son el hígado, bazo y nódulos linfáticos, lo que da como resultado el desarrollo de una hiperplasia linforreticular y el consecuente aumento de tamaño de estos órganos (Reardon y Pierce, 1981) (cuadro 2). Además de afectar órganos parenquimatosos

como el hígado, bazo y nódulos linfáticos, la *E. Canis* se disemina por otros órganos de este mismo tipo para producir vasculitis e inflamación perivascular a nivel de pulmón, riñón y meninges, resultando posible que se desarrolle una coagulación intravascular diseminada (Reardon y Pierce, 1981; Hibler *et al.*, 1989). Los signos clínicos observados durante esta fase son inespecíficos (Harrus *et al.*, 1999), y es probable confundirlos con otras infecciones (leptospirosis, babesiosis y anemias deficitarias), reportándose frecuentemente fiebre, pérdida de peso, apatía, anorexia y vómitos (Parnell, 2004), además de secreción óculo-nasal, palidez de mucosas y, en ocasiones, linfadenomegalia, esplenomegalia y edema en extremidades o escroto (Huxsoll *et al.*, 1970; Woody y Hoskins, 1991; Sainz, 1996; Neer y Harrus, 2006). En esta fase, ocasionalmente pueden presentarse signos hemorrágicos, aunque Neer y Harrus, (2006) reportaron que es más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad. Los perros inmunocompetentes tienden a eliminar el agente en la etapa aguda, en caso de no eliminarlo, la enfermedad progresa a una fase crónica. No se conocen muy bien los mecanismos o factores que transforman infecciones subclínicas en un estado crónico (Harrus *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Fase Aguda *Ehrlichia canis*.

FASE AGUDA	
INCUBACIÓN (8 – 20 días)	
Multiplicación en Monocitos y distribución de tejidos	
DISEMINACIÓN	
Circulatoria, sanguínea y linfática	
VASCULITIS E INFLAMACIÓN PERIVASCULAR	SIGNOS
<ul style="list-style-type: none"> • Pulmón • Riñón • Meninges 	<ul style="list-style-type: none"> • Fiebre • Pérdida de peso • Anorexia • Vómitos
CID	
LEPTOSPIROSIS, BABESIOSIS, ANEMIAS DEFICITARIAS	

En ocasiones pueden presentarse durante esta fase signos oculares, como conjuntivitis, opacidad corneal, uveítis anterior, panuveítis, hipema, hemorragias retinianas, desprendimiento de retina o glaucoma (Harrus *et al.*, 1998; Walser-Reinhardt *et al.*, 2012). Los trastornos hemorrágicos, tanto sistémicos como oculares que pueden aparecer en perros con ehrlichiosis, son debidos a la trombocitopenia (Breitschwerdt, 1987; Troy y Forrester, 1990; Kern, 1994; Nelson y Couto, 1995), sin embargo, se han descrito también hemorragias oculares con valores de plaquetas relativamente normales. Esto puede ser debido a una disfunción plaquetaria por la aparición en el suero de anticuerpos antiplaquetas que se unen a los receptores glicoproteícos plaquetarios (Harrus *et al.*, 1998); asimismo, se ha observado que los linfocitos de perros infectados con *E. Canis* producen un factor inhibidor de la migración de plaquetas, distinto del anticuerpo antiplaquetario, que contribuye a la trombocitopatía (Kakoma *et al.*, 1978).

Se ha demostrado que este factor inhibe la formación de pseudópodos por las plaquetas y torna a las afectadas redondas, agrupadas y permeables. La hiperglobulinemia tiene un efecto inhibidor de la migración y adherencia de

plaquetas circulantes (Greene, 1997). Se ha reportado que pueden aparecer signos respiratorios, entre los que destacan disnea, exudado oculonasal y aumento de la intensidad de los sonidos respiratorios, que pueden deberse al desarrollo de una neumonía intersticial (Codner *et al.*, 1985).

3.1.2. Fase subclínica de la *Ehrlichia canis*

En la mayoría de los animales, la fase aguda se resuelve espontáneamente, progresando la enfermedad a la fase subclínica (Codner y Farris-Smith, 1986) e, incluso, se ha descrito que algunos perros son capaces de eliminar *E. Canis* gracias al desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada (Eddlestone *et al.*, 2007). Durante la fase subclínica el perro únicamente muestra alteraciones biopatológicas, entre las que destacan, la trombocitopenia e hiperglobulinemia (cuadro 3)

Cuadro 3. Fase subclínica *Ehrlichia canis*

FASE SUBCLÍNICA	
Duración	
40 a 120 días o hasta 5 años	
RECUPERACIÓN	SUBCLÍNICA
	Sin signos clínicos
ALTERACIONES BIOPATOLÓGICAS	
1. Trombocitopenia	2. Hiperglobulinemia

Harrus *et al.* (1998), señalaron que las infecciones experimentales en perros han presentado en órganos parenquimatosos como el bazo organismos de *E. Canis* durante la fase subclínica de EMC , siendo este el último órgano antes de eliminarlo. Se piensa que el bazo cumple un papel importante en la patogénesis y expresión de la enfermedad. Este reporte se caracteriza porque a nivel clínico el

animal parece sano, hay ausencia de proceso febril y sintomatología observada en la fase inmediata anterior y recuperando el peso perdido (Woody y Hoskins, 1991). La duración de esta fase resulta ser variable, al menos en infecciones experimentales con duración de entre 40 y 120 días en esta fase (Woody y Hoskins, 1991), mientras que en la infección natural puede durar hasta 5 años (Codner y Farris-Smith, 1986).

3.1.3. Fase crónica de la *Ehrlichia canis*

A la fecha, se desconoce con exactitud el o los factores que pueden influir en la progresión de la enfermedad hacia la fase crónica y parece que aquellos animales que son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada pueden eliminar el agente (Woody y Hoskins, 1991; Neer y Harrus, 2006).

Es muy frecuente que la EMC se diagnostique durante la fase crónica de la enfermedad (Cohn, 2003). Woody y Hoskins, (1991) consideran que apropiado diferenciar una fase crónica leve y una fase crónica grave. La gravedad de esta fase depende de factores como son la virulencia de la cepa de *E. Canis*, el estado inmunitario del perro, la edad, raza, existencia de enfermedades concurrentes o incluso el estrés (Nyindo *et al.*, 1980, Woody y Hoskins, 1991). En esta fase también es posible encontrar signos clínicos inespecíficos similares a los descritos durante la fase aguda, entre los que destacan letargia, anorexia y pérdida de peso. Mylonakis *et al.* (2004), señalaron que en la exploración física con frecuencia hay linfadenomegalia, fiebre, palidez de mucosas y esplenomegalia. Otros investigadores (Harrus *et al.*, 1997, Frank y Breitschwerdt, 1999; Mylonakis *et al.*, 2004) han señalado la frecuencia con que hay signos hemorrágicos, como epistaxis, melena, petequias y/o equimosis, hipema, hemorragias retinianas y hematuria. La trombocitopenia fue el hallazgo hematológico más consistente, seguido de anemia en pacientes caninos con *E. Canis* (Parmar *et al.*, 2012). Neer y Harrus, (2006) mencionaron que en ocasiones pueden observarse alteraciones oftalmológicas, uveítis anterior y diferentes cambios retinianos que pueden

generar ceguera en el paciente debido a hemorragias, vasculitis o infiltración plasmocitaria perivascular en las meninges. La aparición de signos neurológicos como ataxia, paraparesia, déficit en la propiocepción o nistagmo es posible (Woody y Hoskins, 1991, Frank y Breitschwerdt, 1999).

Neer y Harrus, (2006) reportaron que algunos perros con EMC pueden presentar signos locomotores debidos a polimiositis o poliartritis, a causa del desarrollo de hemartrosis o el depósito de inmunocomplejos. Sin embargo, la aparición de esta sintomatología se asocia en la mayoría de los casos con especies granulocitotrópicas, como *E. ewingii* o *A. Phagocytophilum*. También es posible la posibilidad de aparición de signos respiratorios, con exudado nasal, disnea y tos, como consecuencia de neumonía intersticial.

Cuadro 4. Fase Crónica *Ehrlichia canis*.

FASE CRÓNICA					
La gravedad depende de:					
<ul style="list-style-type: none"> • Virulencia de la capa • Estado inmune del perro • Edad • Raza • Enfermedades concurrentes • Estrés 					
FASE CRÓNICA LEVE					
SIGNOS CLÍNICOS ESPECÍFICOS	SIGNOS HEMORRÁGICOS	SIGNOS NEUROLÓGICOS	SIGNOS RESPIRATORIOS	SIGNOS LOCOMOTORES	SIGNOS REPRODUCTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> • Letargia • Anorexia • Pérdida de peso 	<ul style="list-style-type: none"> • Epistaxis • Melena • Petequias • Equimosis • Hiperma • Hemorragias retina • Hematuria 	<ul style="list-style-type: none"> • Ataxia • Deficit en la propiocepción • Paraparesia • Nistagmo 	<ul style="list-style-type: none"> • Exudado nasal • Disnea • Tos • Neumonía Intersticial 	<ul style="list-style-type: none"> • Hematrosis o Depósitos de Inmunocomplejos • Polimiositis • Poliartritis 	<ul style="list-style-type: none"> • Esterilidad • Muerte neonatal • Abortos

Respecto a la fase crónica grave de la EMC, pueden aparecer signos clínicos asociados con el desarrollo de glomerulonefritis y/o hipoplasia o aplasia de médula ósea, las cuales están asociadas a un mal pronóstico de la enfermedad (Cohn, 2003) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Fase crónica grave.

FASE CRÓNICA GRAVE	
Signos clínicos asociados con:	
•	Glomerulonefritis
•	Aplasia médula ósea
•	Hipoplasia médula ósea

En las infecciones naturales por *E. Canis* la sintomatología puede ser similar a la fase aguda y fase crónica, lo cual ocasiona que no siempre sea posible diferenciarlas clínicamente (Cuadro 3, 4 y 5).

Figura 6. Avance de la patogenia por Ehrlichiosis canina

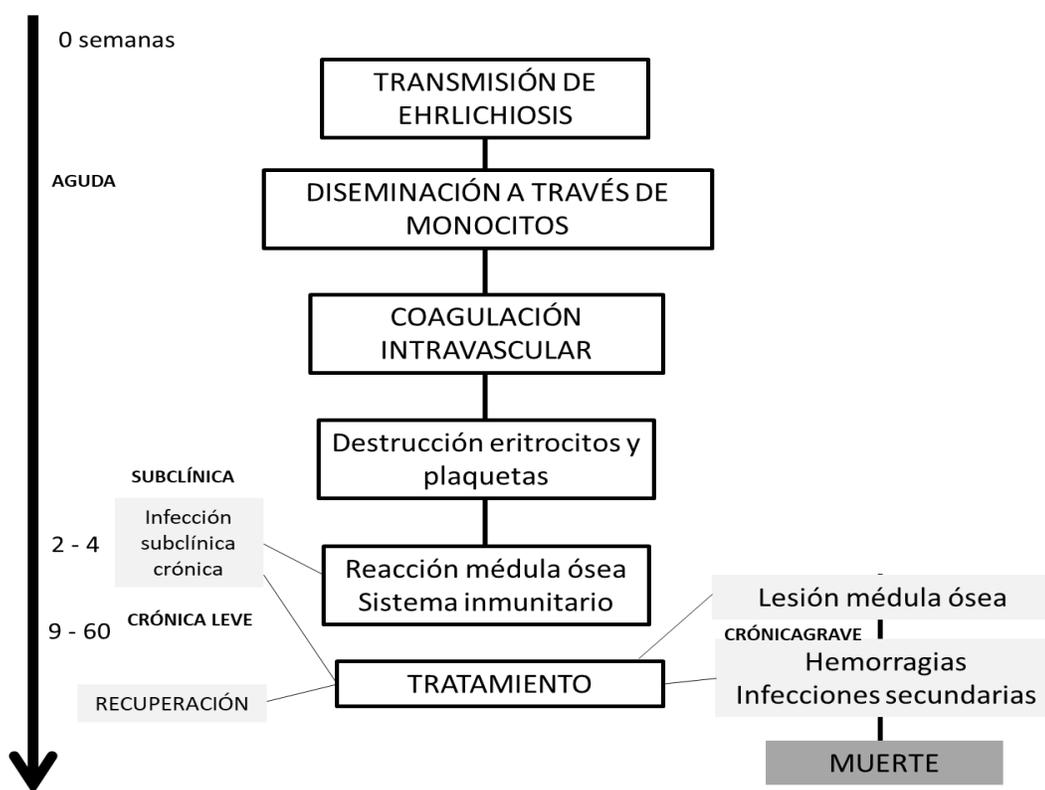
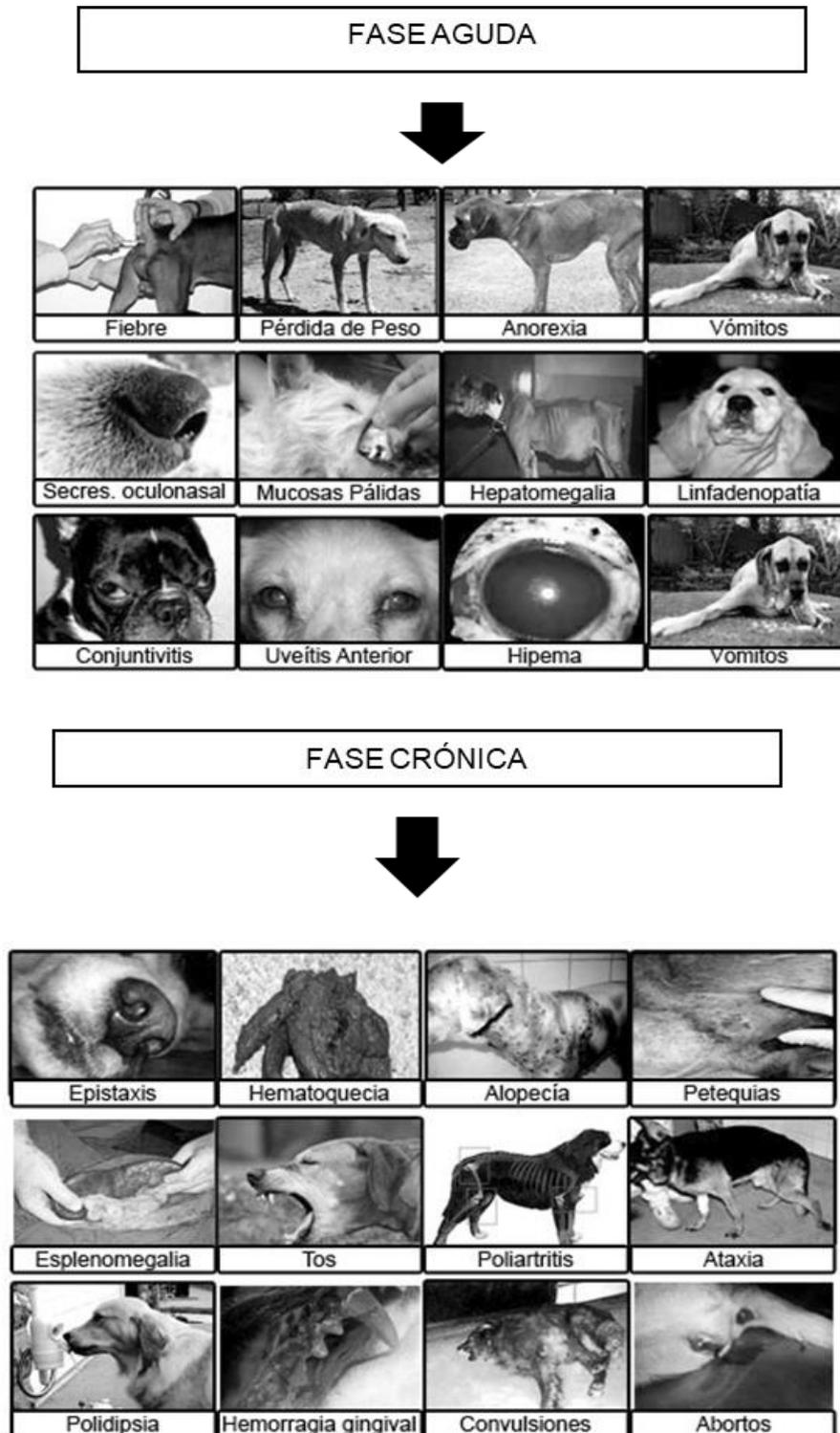


Figura 7. Signos clínicos representativos de la Ehrlichiosis canina.



Capítulo 4. Diagnóstico de la *Ehrlichia canis*

4.1. Diagnóstico de ehrlichiosis

Un buen diagnóstico se basa en el eje principal que es la anamnesis e historia clínica, donde hay posibilidad de identificar la exposición previa del paciente a garrapatas vectores. Esta información, aunada a la identificación de signos clínicos, anormalidades hematológicas, trombocitopatías, alteraciones bioquímicas hemáticas y datos serológicos conllevan a un diagnóstico más certero y preciso (Harrus, Waner y Neer, 2007).

4.1.1. Diagnóstico clínico

La infección por *E. Canis* causa una amplia gama de signos clínicos que varían dentro y entre zonas geográficas. Esto depende de la dosis infectante, raza del perro infectado, estado inmunológico al momento de la infección y de otras enfermedades concomitantes (Sainz *et al.*, 2000). Harrus *et al.* (2007) señalaron que la *E. Canis* no es la única causa de una enfermedad clínica y normalmente aquellos perros con aberraciones inmunitarias pueden llegar a ser secundariamente afectados con enfermedades bacterianas, micóticas, o por protozoos oportunistas.

La forma crónica se caracteriza por pérdida progresiva de peso, anorexia, mucosas pálidas, hemorragias de retina, mucosas y piel. La epistaxis se observa hasta en un 50% de los casos en esta fase y es considerada como distintivo de la enfermedad. Beaufils, (1997) señaló que aparte de ser frecuente la epistaxis en la EMC, también es posible observar signos neurológicos consistentes con meningoencefalitis. Debido a que la EMC produce signos clínicos comunes como depresión, letargo, anorexia, pérdida de peso y tendencias hemorrágicas, la presencia de sangrado por lo general se exhibió por petequias o equimosis dérmicas, o inclusive ambos.

Durante la fase aguda de la enfermedad, la sintomatología varía encontrando desde la depresión, anorexia, fiebre, pérdida seria de la condición física, secreción oculonasal, disnea, linfadenopatía y edema en extremidades o escroto. La trombocitopenia puede observarse desde moderada a intensa y rara vez pueden ser observadas las hemorragias. Pueden ocurrir una variedad de signos del SNC, incluyendo hiperestesia, espasmos musculares y deficiencia de pares craneanos. En ocasiones los pacientes pueden presentar cojera con marcha rígida secundaria a poliartropatía. Harrus *et al.* (2007) señalaron que respecto a la enfermedad articular puede ocurrir por hemartrosis o depósitos de complejos inmunitarios con la consiguiente artritis y derrame neutrofílico en la articulación.

El examen físico también puede revelar linfadenomegalia y esplenomegalia en el 20% y el 25% de los pacientes, respectivamente. Debido a que el organismo se transite por medio de la garrapata (*R. sanguineus*), la enfermedad puede complicarse por infecciones de distintos agentes patógenos (Harrus *et al.*, 2007).

4.1.2. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la ehrlichiosis generalmente se basa en una combinación de anamnesis (considera a pacientes que viven en el área endémica, historia de viajes, infestación por garrapatas), los signos clínicos, alteraciones hematológicas, y los resultados serológicos. Debido a que *E. Canis* se transmite por *R. sanguineus*, la coinfección con otros 23 patógenos transmitidos por la misma garrapata deben ser investigados (Lappin y Turnwald, 2004; Harrus *et al.*, 2007). El diagnóstico de infección por *E. Canis* puede establecerse mediante hallazgos de mórulas en células mononucleares, cultivos, PCR y ELISA; así mismo las especies de ehrlichia pueden aislarse de cultivos tisulares de sangre canina heparinizada infectada o de muestras de aspirados de medula ósea, pero el cultivo tiene disponibilidad limitada, es costoso y tiene baja rentabilidad diagnóstica (Lappin y Turnwald, 2004; Breitschwerdt, 2007; Harrus *et al.*, 2007; Lewis, 2012;). Estudios más recientes señalan que los exámenes de laboratorio correlacionadas

con ultrasonografía permiten detectar las enfermedades y afectación de órganos en la garrapata de las enfermedades intracelulares nacidas del perro (Sarma *et al.*, 2014; Movilla *et al.*, 2017).

4.1.3. Hematología

Además de los signos clínicos que podrían sugerir ehrlichiosis canina, las marcadas anomalías de laboratorio pueden contribuir a la sospecha de la enfermedad. Las anomalías hematológicas, dentro de las anormalidades más importantes compatibles con ehrlichiosis canina se encuentran la trombocitopenia; que es la alteración hematológica más constante en ambos estadios, agudo y crónico. Sin embargo, tras la infección, los recuentos de plaquetas se encuentran a menudo en la zona baja del intervalo de referencia del laboratorio. Se documenta pancitopenia en menos del 25% de los perros en estudios clínicos retrospectivos.

Se ha asociado a ehrlichiosis canina una linfocitosis profunda, acompañada de linfocitos anormales y reactivos. Dado que *E. Canis* da lugar a una función defectuosa de las plaquetas, en los perros con recuentos de plaquetas normales, aumentadas o moderadamente reducidos pueden detectarse hemorragias (Waner y Harrus, 2000; Breitschwerdt, 2007; Harrus *et al.*, 2007, Villanueva, 2014). Harrus *et al.* (2007), reportaron que la anemia que aparece en la fase aguda de la EMC se considera como “anemia inflamatoria de enfermedad” y es un signo clásico de leve a moderada normocítica, normocrómica y no regenerativa.

La ehrlichiosis en el hemograma evidencia anemias arregenerativas, en la fase aguda puede causar pancitopenia, sin embargo en la fase crónica, solo podemos encontrar una ligera trombocitopenia en el hemograma (Sodikoff, 2001; Brockus y Andrasen, 2005). La gravedad de los cambios hematológicos depende de las diferentes especies de ehrlichia.

Durante la infección con *E. Canis* los anticuerpos antiplaquetarios son hallados constantes y algunos perros tienen prueba de Coombs directa positiva. La ehrlichiosis crónica puede causar anemia no regenerativa, trombocitopenia y

leucopenia. La discrasia hematológica puede deberse a supresión de la medula ósea y destrucción de celular sanguíneas (Weiss y Tvedten, 2004; Harrus *et al.*, 2007). Las petequias cutáneas producto de la hemolisis intravascular y alteración plaquetaria son sin lugar a duda un signo característico en el diagnóstico de ehrlichiosis. Villers (2012), señaló que la anemia hemolítica inmunomediada da lugar a una anemia regenerativa; sin embargo la anemia no regenerativa puede ser “pre-regenerativa” debido a una pérdida aguda de eritrocitos antes que se haya establecido la respuesta regenerativa. Contrariamente la anemia no regenerativa verdadera se desarrolla de forma gradual durante semanas a meses. Dependiendo de la causa los eritrocitos pueden destruirse intravascularmente, extravascularmente o ambas.

En la hemolisis extravascular los eritrocitos dañados son fagocitados por los macrófagos, la mayoría en el bazo y hasta cierto punto en el hígado y la medula ósea. En la hemolisis intravascular los eritrocitos son lisados en la circulación como consecuencia de un daño directo a la membrana; por lo tanto la hemoglobina intravascular libre de los eritrocitos forma inmediatamente complejos con la haptoglobina (Villers, 2012).

En la ehrlichiosis suele presentarse anemia hemolítica inmunomediada (AHIM) que es una de las causas de anemia más común en pequeños animales y es también una de las enfermedades inmunomediadas con más prevalencia. La AHIM puede subdividirse en dos tipos principales: anemia hemolítica primaria, idiopática o autoinmune (AHPI), y AHIM secundaria (McBride *et al.*, 2001). La AHIM es una alteración autoinmune clásica sin causa subyacente reconocida. Es la forma más frecuente de AHIM en perros y también aparece en gatos, pero es menos común. Para que el tratamiento sea más efectivo es importante distinguir entre la AHIM primaria y la secundaria. El mecanismo típico fundamental de los casos de AHIM es una destrucción citotóxica de los eritrocitos circulantes, mediada por anticuerpos (hipersensibilidad de tipo II) (Villanueva, 2014). Aunque la mayoría de los casos comparten este mecanismo, la enfermedad es

heterogénea: en la AIHA, la forma más estudiada de AHIM, el modelo de inmunoglobulinas y complementos implicados en la destrucción de eritrocitos (GR), como el lugar de la unión del anticuerpo a las membranas de GR varia ampliamente entre los pacientes. En la AHIM, la unión de los anticuerpos a la membrana de los eritrocitos induce su destrucción mediante varios mecanismos diferentes, la IgM es mejor que la IgG para la fijación del complemento, la hemólisis intravascular más típica en la AHIMs es mediada por IgM. En los casos menos graves de anemia, la unión de anticuerpos y la subsiguiente lesión de membrana celular conducen a un grado acelerado de destrucción de los eritrocitos afectados, por parte de los macrófagos tisulares del sistema mononuclear fagocitario, un proceso que se produce fuera de la circulación. La destrucción de los eritrocitos por el MPS está mediada por receptores de Fc de la superficie de los macrófagos, en los que se une el componente Fc de los anticuerpos junto a las membranas de los glóbulos rojos (Harrus *et al.*, 2007).

Los cambios hematológicos están mejor documentados en infecciones por *E. Canis*, los mismos que incluyen trombocitopenia (82%), anemia (82%), la que, en general, es no regenerativa, y leucopenia (32% de la cual el 20% presentaba neutropenia), la trombocitopenia es un hallazgo consistente en todas las etapas de la infección por *E. Canis*; es posible que esta proporción sea exagerada, así mismo en la fase aguda de la enfermedad es común la leucopenia y la anemia moderada (usualmente normocítica, normocrómica, no regenerativa). Puede haber un descenso en el número de los neutrófilos. Los parámetros eritrocíticos no son afectados normalmente en esta etapa de la enfermedad. La trombocitopenia severa, leucopenia y anemia se presentan más comúnmente durante la fase crónica de la EMC. La pancitopenia severa es la característica de la fase crónica grave y que ocurre como resultado de una médula ósea hipocelular suprimida (Waner y Harrus, 2000).

Harrus *et al.* (2007), mencionaron que dentro de otros parámetros hematológicos estadísticamente significativas incluyen una disminución en el recuento total de

leucocitos en 7 de 9 perros, una disminución en el recuento absoluto de neutrófilos en 5 de 9 perros, una disminución en la concentración de hematocrito y hemoglobina en 3 de 9 perros, una disminución en el volumen corpuscular medio en 5 de 9 perros, y un aumento en la concentración media de hemoglobina corpuscular en 4 de los perros probados; además la fase crónica severa de la EMC se caracteriza por hipoplasia y el deterioro de todas las células de la medula ósea, lo que resulta en pancitopenia.

Las alteraciones de la química del suero más frecuentes incluyen hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, y las actividades de la fosfatasa alcalina y alanina aminotransferasa elevadas, los perros infectados con pancitopenia tienen generalmente los niveles de globulina sérica en bajas concentraciones a comparación con los perros que no tienen pancitopenia (Harrus *et al.*, 2007; Villanueva, 2014).

Otros hallazgos clínico patológicos incluyen sangrado por tiempos prolongados, radiopacidad intersticial pulmonar que van desde un patrón lineal leve a infiltraciones intersticiales marcadas con opacidades peribronquiales, hematuria y proteinuria (Ayllón *et al.*, 2009).

4.1.4. Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas constituyen una base importante para el diagnóstico de la enfermedad, puesto que pueden determinar cualitativamente o cuantitativamente niveles de anticuerpos (IgG o IgM) en los animales afectados por la ehrlichiosis canina (López *et al.*, 2003).

4.1.5. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

El diagnóstico de Ehrlichiosis suele basarse en resultados positivos a la prueba de anticuerpos fluorescentes (IFA) (Neer, 2000). Esta fue desarrollada en 1971, siendo utilizada actualmente para el diagnóstico ehrlichial en caninos e incluso en

el hombre (Greene, 1997). Esta prueba es la más habitual en el serodiagnóstico (Parnell, 2004). La IFA detecta anticuerpos tempranamente (7 días post infección), siendo posible que algunos casos no manifiesten positividad hasta los 28 días post infección (Neer, 2000; Parnell, 2004). Experimentalmente, se demostró que durante los 7 primeros días de la infección inicial, los títulos de anticuerpos son principalmente de IgA e IgM, siendo alrededor de los 20 días post infección mayormente un título de IgG. (Neer, 2000; Mc Bride *et al.*, 2001). La inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) es la prueba más utilizada a nivel mundial para el diagnóstico de infecciones por *E. Chaffeensis* y *E. Canis* (Knowles *et al.*, 2003). Mc Bride *et al.* (2003), trabajaron con inmunofluorescencia indirecta como prueba preliminar para utilizar proteínas recombinantes en el diagnóstico de Ehrlichiosis canina por *E. Canis*. De esta manera, los animales que presentaban títulos mayores o iguales a 40 eran considerados como positivos a *E. Canis*.

4.1.6. Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)

Las pruebas de ELISA, han llegado a ser populares y ser el punto de atención a comparación de las demás pruebas para detectar los anticuerpos de *E. Canis*. Los resultados obtenidos de estos kits son cualitativos y semicuantitativos; sin embargo, se pueden obtener rápidamente en el entorno clínico (De Moráis *et al.*, 2004).

Las pruebas utilizadas son sensibles y específicas, especialmente cuando los títulos de la fluorescencia son mayores que 320. Los kits tienen la ventaja de un bajo costo relativo y proporcionan evidencia de la exposición a *E. Canis*, que luego se asisten con un diagnóstico precoz con un mínimo de equipo y personal (Harrus *et al.*, 2007).

Además de la técnica indirecta para detectar anticuerpos fluorescentes (IFA), la técnica indirecta de ELISA es muy utilizada para detectar anticuerpos contra *E. Canis* (Neer, 2000). En un estudio para calcular la seroprevalencia de *E. Canis* en

la ciudad de Yucatán (México) se trabajó con la técnica indirecta de ELISA, en el cual se indica que la prueba posee un 71% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2004).

La técnica indirecta de ELISA es muy práctica y de fácil realización, la cual se ha convertido en un examen rutinario para el diagnóstico de la ehrlichiosis canina. En Brasil se realizó un estudio, donde se trabajó con esta técnica, indicando que la sensibilidad de la prueba era M 80%, con 100% de especificidad. Algunos casos agudos pueden presentar signos clínicos antes de la aparición de anticuerpos circulantes. Para estos casos debe repetirse la prueba 14 a 21 días después de la primera prueba para su descarte o confirmación (De Moráis *et al.*, 2004).

Rikisha *et al.* (1992) realizaron un estudio para diferenciar infecciones por *E. Canis* y *E. ewingii*. Para ello midió la respuesta de IgG contra ambas infecciones por ELISA indirecta. Se determinó que *E. Canis* produce una respuesta alta de IgG en los caninos, a diferencia de la *E. ewingii*, que no indujo respuesta significativa de esta inmunoglobulina. Además, se concluyó por EITB, que los perros infectados con *E. Canis* inicialmente reaccionan contra proteínas de bajo peso molecular (30, 24 y 21 kDa.) y posteriormente contra proteínas de alto peso molecular (160, 100, 78, 64, 47 y 40 kDa.). De la misma forma los perros infectados con *E. ewingii* presentaron reacciones contra proteínas de alto peso molecular únicamente, no reaccionando contra proteínas de bajo peso molecular. Estos resultados indican que ambas pruebas son de utilidad para diferenciar infecciones con *E. Canis* y *E. ewingii*.

Existe reactividad cruzada entre especies ehrlichiales dependiente de los antígenos de superficie: *E. Canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *Cowdria ruminantium*, tienen un complejo de antígenos mayores de superficie de 24 a 31 kDa de peso molecular; *E. sennetsu*, *E. risticii* y el Agente SF tienen antígenos mayores de superficie de 51 55 kDa; *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma marginale* poseen antígenos mayores de 43- 49 kDa.

No obstante, la diferencia entre grupos ehrlichiales, presentan una reacción cruzada baja. El antígeno mayor de superficie más común es el HSP60, y el tamaño de esta molécula varía dependiendo de la especie. Esta molécula también tiene reacción con especies del género *Rickettsia spp.* (Dumler *et al.*, 2001). Actualmente, no se dispone de una prueba para *E. ewingii*, ya que esta especie no ha podido ser cultivada *in vitro* más allá del aislamiento en células primarias (Greene, 2000). *E. Canis* y *E. sennetsu* reaccionan en forma cruzada intensa. Por otra parte, *E. risticii* presenta reacción cruzada potente con *E. sennetsu* y, en menor grado, con *E. Canis*. *E. equi* y *E. senetsu* muestran reactividad cruzada antigénica importante y de hecho están muy relacionadas. Cabe resaltar que la reacción cruzada entre *E. Canis* y otros patógenos no ehrlichiales es limitada (Greene, 1997).

4.1.7. Frotis sanguíneo

Inicialmente, los primeros estudios hacían uso de la tinción de Gram, conforme la ciencia avanza, a la fecha se considera inadecuada para visualizar las bacterias intracelulares debido a la falta de contraste contra el citoplasma de la célula hospedadora. Desde finales de la décadas de los 90`s, la tinción Romanowsky ha sido la más utilizada, pues se cuenta con la capacidad para teñir las bacterias de color púrpura, permitiendo la visualización de las “mórulas”, las cuales miden de 1.5 a 6 μm de diámetro (Popov *et al.*, 1998). Las mórulas pueden observarse hasta en el 60 % de los pacientes infectados (Kohn *et al.*, 2008). En perros infectados experimentalmente, las mórulas se observan 4 días después de la inoculación y persisten durante 4 a 8 días (Egenvall *et al.*, 2000). Sin embargo, no es posible distinguir entre otras mórulas de *Anaplasma* y *Erlichia spp* que afecten a los neutrófilos, por lo que el diagnóstico debe ser confirmado empleando la técnica de PCR (Sainz *et al.*, 2015; Movilla *et al.*, 2017).

4.1.8. Cultivo

Las variantes anaplasmosis pueden ser cultivadas en la línea celular promielítica humana HL-60 (Goodman *et al.*, 1996), y en líneas celulares de embriones de garrapata *Ixodes scapularis* (Munderloh *et al.*, 1996; Munderloh *et al.*, 2004; Woldehiwet *et al.*, 2002; Woldehiwet y Horrocks, 2005) y en células endoteliales capilares bovinas humano, mono y (Munderloh *et al.*, 2004).

4.1.9. Serología

La infección por *A. phagocytophilum* puede diagnosticarse a través de serología por medio de pruebas comerciales de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y por medio de ELISA de punto. La prueba IFA utiliza organismos enteros cultivados como fuente de antígenos. Estudios experimentales utilizando como método diagnóstico IFA han mostrado que la seroconversión en los perros puede ocurrir de dos a cinco días después de la aparición de mórulas en sangre periférica (Egenvall *et al.*, 1997). En otro estudio donde utilizaron sueros recolectados de casos confirmados de infección por *A. phagocytophilum* en diversas especies, se observó que todas las muestras de suero fueron positivas a títulos con diluciones de 1:80 o mayores, siendo los más altos $\geq 1:320.13$ por esta razón, un título $\geq 1:80$ se considera positivo para anticuerpos contra *A. phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 1995).

En las pruebas comerciales de ELISA de punto (SNAP 4Dx) para diagnóstico de *A. phagocytophilum* se emplea un péptido sintético basado en la proteína p44 inmunodominante de *A. phagocytophilum* como antígeno. En una investigación se encontró que los perros inoculados experimentalmente tuvieron resultados positivos 8 días después de la inoculación y permanecieron positivos durante un periodo de casi un año a pesar de estar clínicamente sanos; además sus frotis sanguíneos no revelaban microorganismos en los neutrófilos circulantes (Alleman *et al.*, 2006). En los ensayos de rendimiento, la sensibilidad y especificidad de la prueba SNAP 4Dx para anticuerpos contra *A. phagocytophilum* fue 99,4% y 100%, respectivamente. Se debe considerar que esta prueba solo detecta anticuerpos, lo

que indica que el animal estuvo en contacto con la enfermedad, más no que en el momento la presente (Chandrashekar *et al.*, 2010).

4.1.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es el método más sensible para la detección del ADN de microorganismos en la sangre periférica de un animal infectado. Varios laboratorios comerciales ofrecen PCR para detección de *A. phagocytophilum* en sangre. Para realizar este análisis la muestra de sangre debe ser tomada en tubos con EDTA, las muestras deben ser recogidas antes de iniciar la terapia antimicrobiana para evitar falsos negativos por esta causa. En infecciones subclínicas también puede dar falsos negativos debido a que *A. phagocytophilum* puede circular de forma intermitente en estos animales; por lo tanto, el análisis de PCR no debe considerarse como un método definitivo para excluir la infección subclínica en los animales clínicamente normales que son seronegativos (Alleman *et al.*, 2006; Alleman *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Movilla *et al.* (2017), con setenta y siete muestras de sangre de EDTA y 64 muestras de tejido esplénico obtenidas de 78 perros con enfermedad esplénica en un área mediterránea, se identificó la presencia de enfermedades como *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum*, *Mycoplasma* spp. y *Rickettsia* spp, las cuales fueron detectadas mediante ensayos de PCR.

Parmar *et al.* (2012), realizaron diagnóstico de ehrlichiosis canina en 40 perros con síntomas asociados a la *E. Cani*. Los investigadores evaluaron la eficacia del examen de sangre, del frotis de capa blanda, del kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y la reacción en cadena de polimerasa anidada (PCR). En sus resultados señalan que observaron microorganismos rickettsianos intracitoplásmicos en frotis de un solo perro (2,5%) con un nivel extremadamente bajo de parasitemia, mientras que la PCR anidada con rRNA 16S reveló bandas características de 378 pb indicando una reacción positiva en 8 (20,0%) perros y las muestras de sueros de 21 (52,5%) perros revelaron anticuerpos anti-Ehrlichia. El perro que reveló organismos en la sangre también mostró resultados positivos

con los otros 2 métodos diagnósticos. Todas las muestras de sueros de perros con resultados positivos de nPCR fueron positivas para anticuerpos anti-Ehrlichia. Los 8 perros que presentaron resultados positivos por nPCR y dot-ELISA fueron incluidos en el estudio de la caracterización clínica, hematológica y bioquímica de la enfermedad.

Kaewmongkol *et al.* (2015) reportaron un caso de *Ehrlichia canis* en una hembra de la raza poodle, cuya bacteria fue detectada en fluido espinal de un no trombocitopénico con meningoencefalitis por PCR de amplio rango. Para confirmar la infección por *E. Canis*, se realizaron PCR anidada y análisis de secuencia utilizando muestras de aspirado de médula ósea y CSF. El ADN se purificó a partir de cada muestra usando el kit de sangre y tejido DNeasy (QIAGEN, Valencia, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante

Los resultados de estas investigaciones indican cierta sensibilidad a la prueba, y resaltan la importancia de realizar pruebas de laboratorio para realizar el diagnóstico certero de la *E. Canis*, siendo la PCR uno de los estudios más importantes.

Capítulo 5. Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos de animales infectados por *Ehrlichia Canis*

5.1 Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos ocasionados por *Ehrlichia muris* en ratón como modelo animal

5.1.1. Daños Microscópicos

Un estudio realizado por Saito *et al.*, (2015) desarrollo un experimento en un modelo de ratón para ehrlichiosis humana con el recientemente descubierto patógeno humano (*Ehrlichia muris*). Los investigadores inocularon tres cepas de ratones con diferentes dosis de EMLA por vía intravenosa, intraperitoneal o intradérmica y se evaluaron los cambios clínicos y patológicos durante el curso de la infección. Todos los experimentos se realizaron en ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). El análisis histopatológico de los órganos infectados con EMLA reveló cambios progresivos leves durante el curso de la infección. Señalando que la infección letal indujo inicialmente la proliferación de hepatocitos, observada como numerosas figuras mitóticas (Figura 8A, 8B). Con la progresión de la enfermedad, se observaron algunos cambios más en órganos parenquimatosos. Por ejemplo, a nivel del hígado, las figuras mitóticas seguían presentes pero eran menos numerosas. Sin embargo, el aumento de la frecuencia de pequeños focos de infiltración celular mononuclear y hepatocitos apoptóticos adyacentes se identificaron de forma difusa en todo el hígado (Figura 8C y 1D). Otros órganos parenquimatosos que contenían células infectadas, aparentemente células endoteliales, fueron el corazón (especialmente las aurículas), el riñón y la médula ósea (Figura 8E-F), además de órganos tubulares como los intestinos.

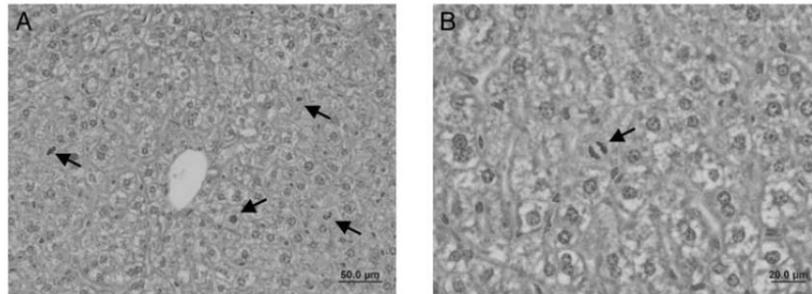
Es importante resaltar que los órganos parenquimatosos como el hígado y los ganglios linfáticos de ratones infectados con EMLA-IS demostraron marcados cambios histopatológicos. En el día 9 posteriores al periodo de infección, los

animales incluidos en el estudio exhibieron infiltración de hígado con células inflamatorias. En este sentido, se encontró que los ratones infectados con EMLA transmitido por garrapatas, demostraron figuras mitóticas hepatocelulares, apoptosis e infiltración lobulillar multifocal de células inflamatorias en el hígado (Figura 8 A-C).

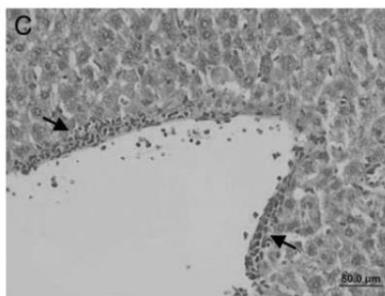
En el día 30 posteriores a la infección se observaron pocos focos de infiltración inflamatoria en hígado, pulmón y piel de ratones infectados con EMLA-IS. Se observó una mayor infiltración de células inflamatorias y edema en ratones antes de la muerte (Saito *et al.*, 2015). Las mismas lesiones se observaron en animales menos de 24 horas antes de la muerte. Estas lesiones experimentaron una rápida progresión cuando los animales estaban moribundos, con más focos de células apoptóticas y aumento de la infiltración de células mononucleares en el hígado. La congestión vascular se observó en la mayoría de los órganos en la fase tardía de la infección. En dicho estudio, se observó aumento de las células de Kupffer en el hígado los días 12-13 después de la infección. La tinción con IHC reveló la presencia de EMLA en todos los tejidos evaluados, especialmente en la etapa tardía de la infección letal.

Figura 8. Proliferación de hepatocitos.

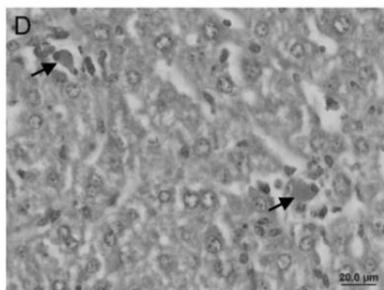
Cambios histopatológicos en el hígado de ratones infectados con Ehrlichia muris, como agente (EMLA).



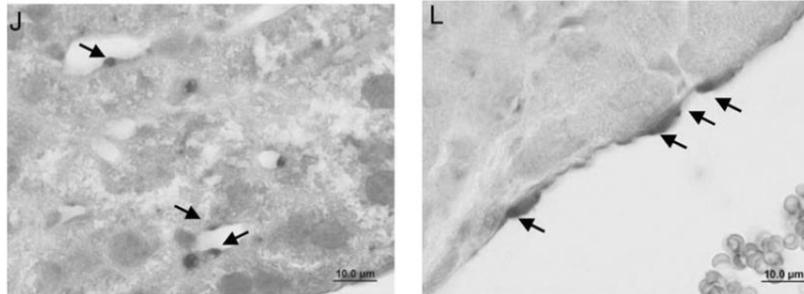
A y B, Figuras mitóticas (flechas) el día 5 después de la infección en hígado de ratones infectados con una dosis letal de EMLA (20 x y 40 x aumentos originales, respectivamente).



C, infiltración celular perivascular al día 9 después de la infección en el hígado de un ratón letalmente infectado (40 x aumento original).



D, Células apoptóticas (flechas) al día 9 después de la infección en el hígado de un ratón letalmente infectado (40 veces el aumento original).

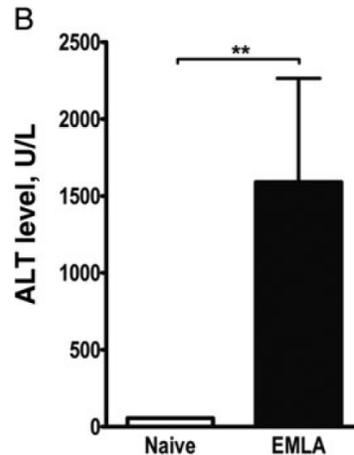


E-F, EMLA morulae (flechas) en las células endoteliales en el hígado y aurícula cardíaca (100 x aumento original), respectivamente, durante la infección letal. (Saito *et al.*, 2015).

5.1.2. Daños Macroscópicos

Saito *et al.* (2015), realizaron una evaluación del nivel de una enzima a nivel de un órgano parenquimatoso como hígado, los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero aumentaron significativamente durante la última etapa (día 10 después de la infección) de la infección letal por EMLA, en comparación con los ratones de control, sus niveles fueron tan altos como 2400 U / L (Figura 9). Lo cual señala un daño a nivel macroscópico a causa de la *Ehrlichia Canis*.

Figura 9. Hallazgos clínicos y hematológicos durante la fase aguda de la infección en ratones infectados con Ehrlichia muris-like agent (EMLA) IV.



Concentración sérica de alanina aminotransferasa (ALT) en ratones infectados letalmente con EMLA el día 10 después de la infección.

5.2 Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos ocasionados por ehrlichiosis monocítica humana

5.2.1. Daños Microscópicos

La ehrlichiosis monocítica humana (HME) es ocasionada por *Ehrlichia chaffeensis*, entre sus signos más notables, se incluye la fiebre, mialgias y pancitopenia en el 80 a 90% de los pacientes, además de elevación en los niveles séricos de transaminasas. Las manifestaciones clínicas del HME varían, y los hallazgos de laboratorio y las manifestaciones hepáticas pueden llevar a un diagnóstico diferencial que va desde colangitis a colecistitis o desde hepatitis crónica leve a falla hepática progresiva (Nutt y Raufman, 1998). Para realizar la detección de enfermedades intracelulares en el perro ocasionadas por la garrapata es necesario contar con los hallazgos de laboratorio (Sarma *et al.*, 2014).

Los estudios histopatológicos de muestras de biopsia de médula ósea sugieren que las manifestaciones de HME son el resultado de la activación mononuclear de fagocitos (Lee y Rikihisa, 1997). A finales de los 90`s, poco se sabía sobre la patología de la lesión hepática observada en HME ya que los aumentos en las actividades de transaminasas séricas generalmente son de leves a moderados y la trombocitopenia a menudo previene la biopsia hepática en pacientes clínicamente enfermos (Nutt y Raufman, 1998). Para dilucidar aún más la patología y patogénesis de la lesión hepática en HME, Dumler, 2015 estudio secciones hepáticas de pacientes con infecciones confirmadas de *E chaffeensis*.

Debido a lo anterior, la patología de la lesión hepática debe ser estudiada en tejidos hepáticos de pacientes con HME confirmada con técnicas de laboratorio. Smith y Dumler (2003), examinaron la tinción con H&E y tinciones inmunohistoquímicas para *E chaffeensis* y marcadores de leucocitos. Inicialmente realizaron un examen al microscopio de las secciones del órgano parenquimatoso hígado de pacientes con Ehrlichiosis Humana, el cual fue teñido con la sustancia H&E, los hallazgos microscópicos del estudio revelaron focos linfohistiocíticos lobulares dispersos en cada uno de los 7 casos. En 4 de los 7 pacientes incluidos en el estudio hubo un patrón de infiltración linfohistiocítica difusa de sinusoides hepáticos o hiperplasia de células de Kupffer con evidencia de aumento de la fagocitosis. Con mayor frecuencia estuvieron presentes focos linfohistiocíticos lobulillares dispersos e infiltración linfohistiocítica difusa aunada a hiperplasia de células de Kupffer con aumento de la fagocitosis.

En 5 de los 7 pacientes del mismo estudio se observaron diversos grados de lesión y muerte de células hepáticas. La colestasis fue evidente en 6 casos, a veces con lesión epitelial del conducto biliar. Además hubo presencia de abundantes células mononucleares infectadas con *E chaffeensis* que infiltraron lóbulos o regiones porta en células de Kupffer. La inflamación fue desproporcionada a la infección en 6 casos. En ausencia de hepatocitos infectados o células epiteliales biliares, estos hallazgos sugieren que las

respuestas inflamatorias o inmunes del huésped contribuyen a la lesión hepática observada en HME.

El estudio de estos investigadores permitió observar varios grados de lesión en células hepáticas y muerte. Por ejemplo, la colestasis fue evidente en 6 casos, a veces con lesión epitelial del conducto biliar. En 5 pacientes se observaron células mononucleares infectadas con *E chaffeensis* rara, que infiltraron lóbulos o células de Kupffer. La inflamación estuvo fuera de proporción con la infección en 6 casos. En ausencia de hepatocitos infectados o células epiteliales biliares, estos hallazgos sugieren que las respuestas inflamatorias o inmunitarias del huésped contribuyen a la lesión hepática observada en HME.

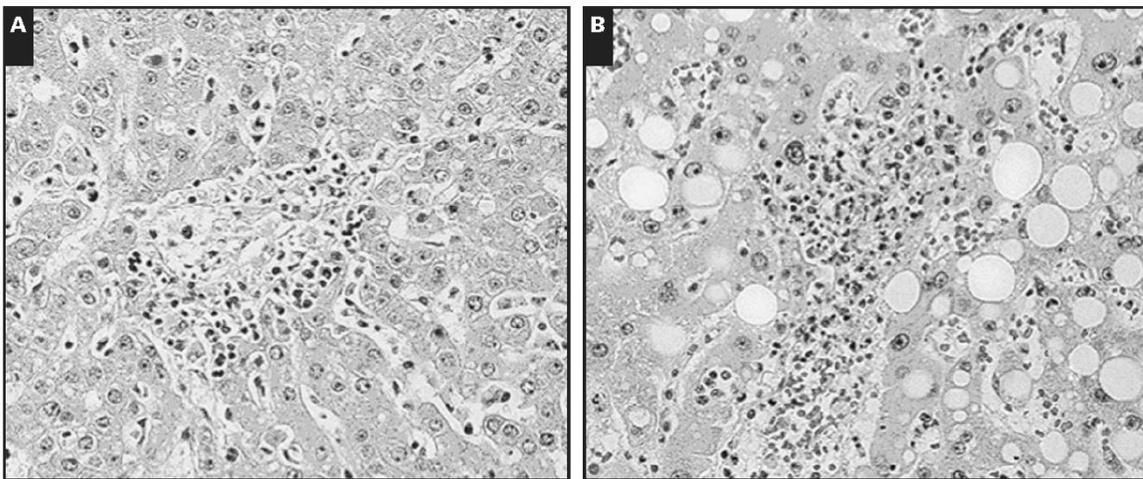
Un estudio en el que trabajaron con ehrlichiosis humana, se identificó que del 60% al 70% de los pacientes presentan leucopenia y trombocitopenia, y del 80% al 90% de los pacientes pueden presentar aumentos leves a moderados de las actividades de transaminasas séricas (Olano y Wlaker, 2002; Dumler y Walker, 2001).

El examen microscópico de las secciones del órgano parenquimatoso hígado teñidas con H&E de la investigación de Smith y Dumler, (2003) reveló focos de linfocitos lobulares dispersos en cada uno de los 7 casos. En 4 casos, hubo un patrón sugestivo de infiltración linfocítica difusa de los sinusoides hepáticos o hiperplasia de células de Kupffer con evidencia de aumento de la fagocitosis (figura 10).

Se observaron lesiones necróticas adyacentes a las venas centrales en 1 caso Imagen 10A. En otro caso, se observó necrosis coagulante en una distribución irregular. La colestasis moderada a marcada fue evidente en 6 casos, a veces asociados con lesión epitelial del conducto biliar Imagen 10B. Dos casos presentaron evidencia de inflamación inespecífica de los hepatocitos y acumulación de grasa. Dos casos presentaron tejido insuficiente para estudios inmunohistoquímicos posteriores, y en 1 caso, la fijación inadecuada impidió la interpretación de la tinción inmunohistoquímica. En los 4 casos restantes, el

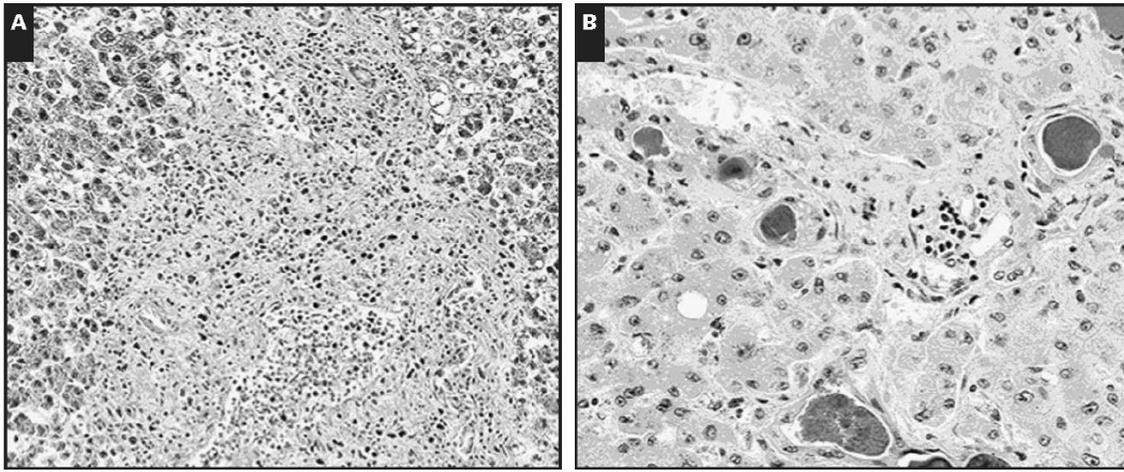
análisis inmunohistoquímico demostró predominantemente linfocitos T e infiltrados de fagocitos mononucleares en los lóbulos y los tractos portal. Las manchas Ki-67 demostraron una tasa proliferativa variable, observada principalmente en células mononucleares infiltrantes o células de Kupffer (figura 11). En 2 casos, hubo un índice de proliferación Ki-67 (<5%) muy bajo. (Smith y Dumler, 2003).

Figura 10. Examen microscópico de luz de las secciones de hígado teñidas con H&E.



Focos linfohistiocíticos lobulares dispersos identificados en los hígados de 2 pacientes con ehrlichiosis monocítica humana. B, hinchazón inespecífica de los hepatocitos y acumulación de grasa (A y B, H&E, aumento original × 200) (Smith y Dumler, 2003).

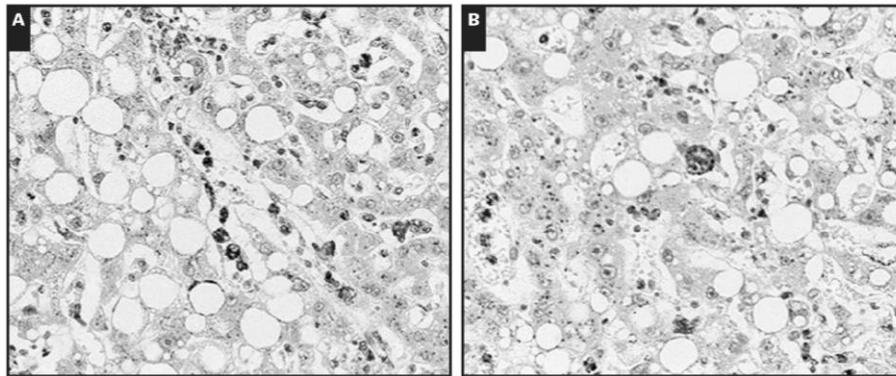
Figura 11. Manchas Ki-67.



Lesión del parénquima hepático y del conducto biliar en la ehrlichiosis monocítica humana. A, lesión necrótica en el hígado adyacente a una vena central (H&E, aumento original x 100). B, Colestasis marcada asociada con lesión epitelial del conducto biliar (H&E, aumento original x 200).

De los 2 casos que mostraron un leve a moderado aumento en el índice de proliferación Ki-67, 1 caso mostró aproximadamente 10% de tinción y 1 caso de tinción al 30% de las células mononucleares sinusoidales. En los casos sin necrosis hepática o colestasis, los anticuerpos contra CD68 (KP1) confirmaron infiltrados sinusoidales marcados de células mononucleares o macrófagos. Además, CD68 manchas mostraron leve hiperplasia de células Kupffer y destacó un aumento del nivel de fagocitosis por las células mononucleares (figura 12).

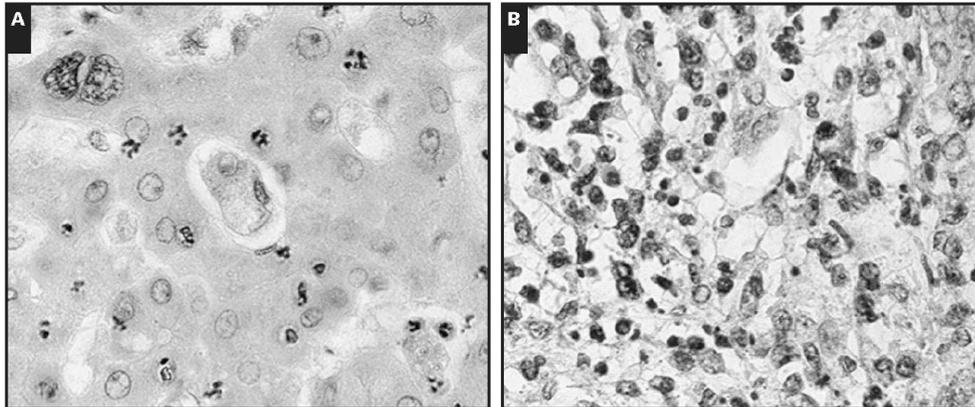
Figura 12. Hiperplasia de células Kupffer.



La tinción inmunohistoquímica con el marcador de macrófagos KP1 demuestra histiocitos prominentes en los sinusoides hepáticos y la hiperplasia de células de Kupffer (A) y evidencia de eritroleucofagocitosis (B) (A y B, inmunotinción KP1, aumento original x 200) (Smith y Dumler, 2003).

Los estudios inmunohistoquímicos para organismos intracelulares revelaron células infrecuentes a abundantes de *E chaffeensis* en 5 de 6 casos en los que se realizaron exámenes. Cuando estaban presentes, las mórulas ehrlichiales se observaban sólo en células mononucleares o Kupffer infiltrantes. Las células infectadas fueron abundantes en un paciente con infección por el VIH12 y otro con gammapatía monoclonal de larga data de importancia indeterminada.¹³ Las células infectadas fueron poco frecuentes o raras en 3 de los casos en los que no se conocían enfermedades preexistentes estuvieron presentes (figura 13).

Figura 13. Demostración inmunohistoquímica de *Ehrlichia chaffeensis* morulae en macrófagos hepáticos y células de Kupffer.



En un caso (A) y gran número de células infectadas en caso (B) (A, anti-*E chaffeensis*, aumento original $\times 640$, B, anti-*E chaffeensis*, aumento original $\times 400$).

5.3 Daños Microscópicos y macroscópicos en órganos parenquimatosos de perros infectados por *Ehrlichia Cani*

Respecto a la *Ehrlichia Canis*, se ha informado que la hepatomegalia está asociada con esta infección, no obstante no es un hallazgo que caracterize a la enfermedad como tal. Respecto a las células inflamatorias en pacientes con *E. Canis* a menudo incluyen macrófagos y linfocitos en órganos parenquimatosos como pulmón e hígado.

5.3.1. Daños Microscópicos

Nair (2016), realizó la inoculación de la infección por *E. Canis* y *E chaffeensis*. Ambos organismos fueron cultivados *in vitro*, los inóculos se prepararon y se utilizaron para generar infecciones de *E. Chaffeensis*. Las bacterias cultivadas en la línea celular de macrófagos caninos se recuperaron por centrifugación lavando los sedimentos celulares con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los

sedimentos celulares se re suspendieron a una concentración de 2x10⁸ organismos de Ehrlichia por mL de PBS y se usaron para realizar infecciones en los animales, administrando 1 mL de la solución por vía intravenosas en cada paciente. Posterior a la infección, se obtuvieron muestras de tejido de órganos parenquimatosos como son cerebro, médula ósea, pulmón, hígado, bazo, riñón, corazón, glándulas suprarrenales y nódulos linfáticos. Las muestras se fijaron en formalina al 10% durante 24 h y se procesaron en un procesador de infiltración de vacío Tissue-Tek1 VIP1 6 (Sakura Finetek, CALIFORNIA). Los tejidos procesados se colocaron en parafina y se prepararon secciones de hematoxilina y eosina (H&E) de 5 µm de grosor según los protocolos estándar seguidos rutinariamente en KSVDL.

Cuadro 6. Escala de clasificación de lesiones macroscópicas en órganos infectados de perros.

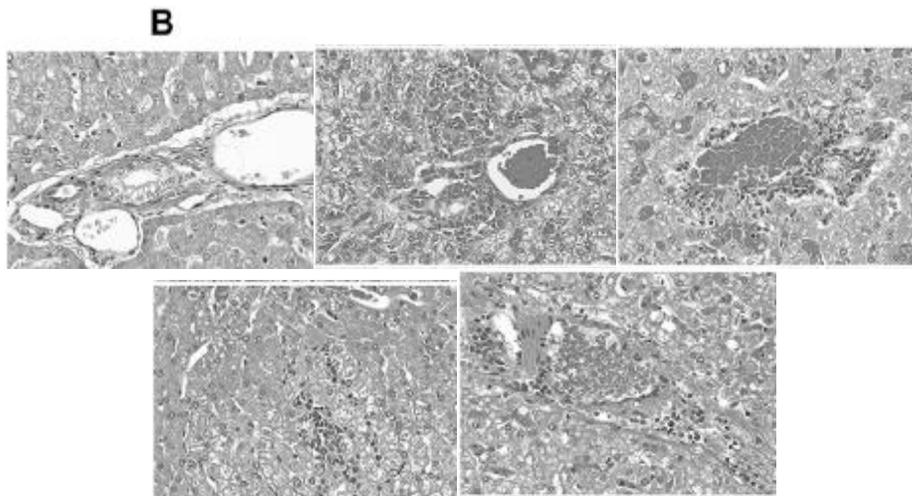
Órgano	0	1	2	3
pulmón	inflamación no notable	microgranulomas raros y pequeños números de inflamación perivascular	microgranulomas ocasionales y cantidades moderadas de inflamación perivascular	microgranulomas frecuentes y grandes cantidades de inflamación perivascular
Hígado	sin inflamación notable	inflamación periportal leve con microgranulomas sinusoidales	inflamación periportal moderada y centrípeta con microgranulomas sinusoidales	inflamación marcada periportal y centrípeta con microgranulomas sinusoidales
Bazo	vainas linfáticas periarteriales normales (PALS)	hiperplasia PALS leve	hiperplasia PALS moderada	hiperplasia PALS marcada

Todas las observaciones histopatológicas fueron evaluadas por un patólogo anatómico certificado Las lesiones microscópicas de los órganos parenquimatosos se observaron principalmente en pulmón, hígado y bazo; las lesiones se

clasificaron en una escala numérica de 0 a 3 para cada tejido en función de la gravedad y la distribución de las lesiones en dos secciones de cada tejido. La escala numérica de calificación utilizada fue de acuerdo al cuadro 6.

En el estudio de Nair (2016) se asignó una puntuación combinada para cada animal a partir de la suma de las puntuaciones individuales para cada tejido en una escala de 0 a 9, donde la puntuación más alta sugiere lesiones más graves. Dentro de los resultados más notables, se observó que en el grupo infectado con *E. Canis*, las lesiones hepáticas presentaron infiltrados periportales moderados de linfocitos y macrófagos con ocasionales microgranulomas sinusoidales. En la figura 14 se indican los cambios histopatológicos a nivel de tejidos hepáticos en perros infectados con *E. Canis*, *E. chaffeensis*, *A. platys* y *A. Phagocytophilum*.

Figura 14. Cambios histopatológicos en perros como resultado de infección.



Se observan tejidos hepáticos con infiltrados periportales de linfocitos y macrófagos con variación en el grado de inflamación.

5.3.2. Daños Macroscópicos

Sarma *et al.* (2014) realizaron un estudio en una Policlínica Veterinaria del Instituto de Investigación Veterinaria de la India. Los investigadores reportaron 101 casos

positivos a enfermedades hemoparasitarias intracelulares transmitidas por garrapatas como ehrlichiosis (n = 60), babesiosis (n = 10), anaplasmosis (n = 5), hepatozoonosis (n = 4) e infección mixta (n = 22). Estos casos fueron seleccionados independientemente de la raza, edad y sexo. Los investigadores se centraron en los hallazgos de órganos parenquimatosos como hígado y bazo. Realizaron un estudio de ultrasonografía del hígado y bazo de acuerdo a los procedimientos descritos por Nyland y Mattoon (2002). Para dicho examen se utilizó un escáner ultrasónico 200 Vet (Pie Medical, Netherland) o Sonosite modal 600 M y un transductor AAS de 5,0 MHz. El área abdominal se afeitó y se aplicó gel acústico en el abdomen antes del sonograma para asegurar un contacto íntimo de la cabeza del escáner con la superficie del cuerpo.

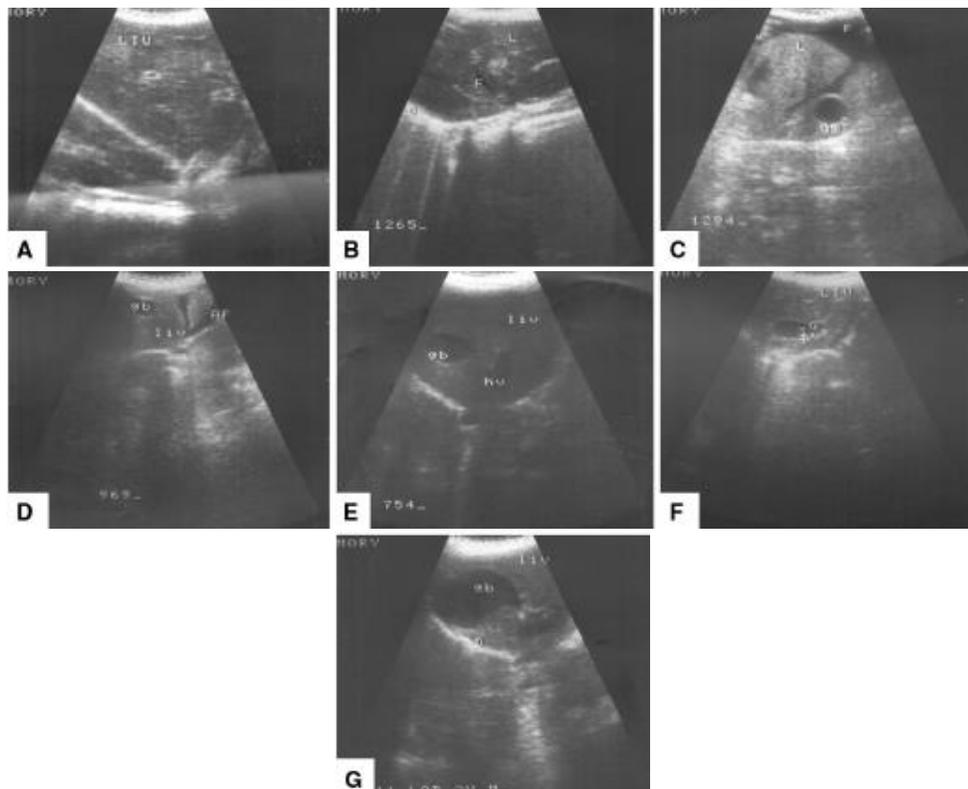
En relación al examen ultrasonográfico del hígado, el transductor se colocó detrás de la línea media del xifisternum y en ángulo cráneo dorsal para imagen de una sección transversal del hígado. El transductor se movió gradualmente caudalmente restante en la línea media y la cabeza del transductor se hizo girar a 90° para obtener una imagen de la sección longitudinal del hígado en la línea media. Los investigadores evaluaron el tamaño del hígado, forma, contorno y arquitectura interna, incluyendo alteraciones en la ecogenicidad e intensidad (anecoica / hipoecoica / hiperecoica / normoecóica).

En relación al órgano parenquimatoso bazo, se obtuvo la imagen ultrasónica con el paciente en posición decúbito espinal, visualizando su tamaño, ecogenicidad y forma.

De los resultados más notables de esta investigación, el ultrasonido reveló que de los 60 casos de ehrlichiosis, hubo hipoecogenicidad del hígado en el 51,67% de los pacientes. El 20% de los casos presentaron hepatomegalia y 20% de ascitis seguido de esplenomegalia de 8,33%. Recordando que el estudio Nair *et al.* (2016) reportaron esplenomegalia en un perro infectado con *E. Canis*.

En la figura 15, se observa la hipoeogenicidad hepática además de otros hallazgos ecográficos de trastornos por TBDs intracelulares en perros infectas con *E. Canis*. (Sarma *et al.*, 2014).

Figura 15. Ultrasonografía abdominal de enfermedades ocasionadas por garrapatas en perros.

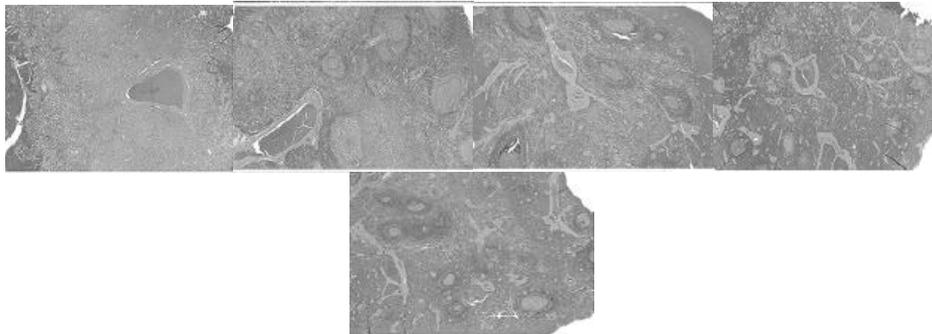


Hipoecoico focal con hepatomegalia grave (a), nódulo hiperecoico focal en el parénquima hepático con líquido interlobular (b), hígado diseminado con líquido ascético (c), estructura anecoica que rodea el hígado (d), GB distendido con hepatoma hinchado vena (e), colecistitis (3,9 mm) con hígado focal hipo-ecoico (f), distensión vesicular biliar severa con estructura llena de líquido anecoico (g).

5.3.3. Daños en Bazo

El bazo es un órgano altamente perfundido involucrado en el control inmunológico y la eliminación de patógenos transmitido por vectores (VBP), que podrían tener un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad esplénica. Movilla *et al.* 2017 realizaron un estudio con 67 muestras de sangre de EDTA y 64 muestras de tejido esplénico obtenidas de 78 perros con enfermedad esplénica en un área mediterránea. Reportaron enfermedades como *Ehrlichia spp.*, en cuyo estudio histológico hubo presencia de hematoma y congestión en una muestra de bazo congelado, proveniente de un perro positivo a *Ehrlichia cani* (figura 16).

Figura 16. Cambios histopatológicos en perros como resultado de infecciones de *E. Canis*.



Los tejidos del bazo muestran hiperplasia de hoja linfoide periarteriolar (pulpa blanca) con variación en el tamaño de la pulpa blanca en los grupos infectados. El aumento fue de 400x de hígado.

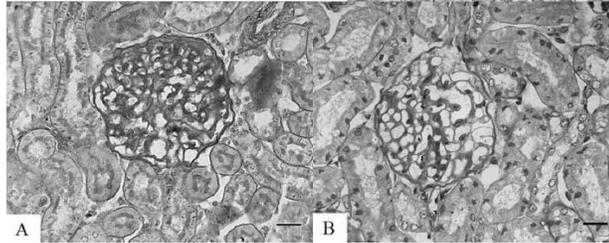
5.3.4. Daños en Riñón

Se ha descrito que la Ehrlichiosis monocítica canina (EMC) causa afectación renal en casos crónicos, aunque se desconoce la clasificación histopatológica de los patrones de glomerulopatía. En este sentido Silva *et al.* (2016), realizaron un estudio en el que propusieron evaluar el patrón histopatológico, centrándose en los tipos de glomerulonefritis de riñones procedentes de perros infectados de

forma natural con *Ehrlichia canis*. En su estudio, utilizaron 12 perros infectados y 6 perros sanos. Después de la evaluación clínica y la confirmación diagnóstica, se sacrificaron los animales y se obtuvieron fragmentos de riñón realizar el examen histopatológico con tinciones de incluyen hematoxilina y eosina (HE), tricrómico de Masson, ácido peryódico Schiff (PAS), ácido peryódico-metenamina de plata (PAMS) y rojo Congo manchar. El análisis histopatológico de perros con CME demostró que las lesiones principales estaban presentes en el glomérulo y la región tubulointerstitial en el 100% de los casos. El tipo de lesión glomerular fue membranoproliferativo en 83.33% y proliferativo en 16.67% de los perros. La nefritis intersticial estuvo presente en la región cortical de todos los perros infectados. El infiltrado inflamatorio linfohistiocítico de mínima a marcada estaba presente en las áreas intersticial, perivascular y periglomerular. El recuento diferencial de células inflamatorias indicó que los linfocitos predominaron en comparación con las células plasmáticas y los histiocitos. Se observaron fibrosis intersticial y cilindros hialinos de menor intensidad.

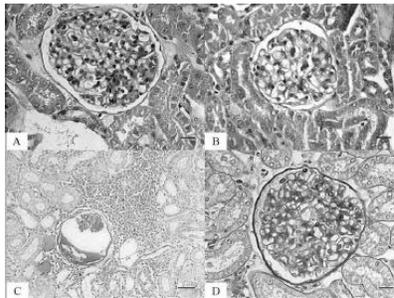
En sus análisis estadísticos, reportaron una correlación negativa entre los niveles de albúmina sérica y la gravedad de la glomerulopatía. En conclusión, la glomerulopatía membranoproliferativa y la nefritis intersticial fueron las principales lesiones renales en CME, sugiriendo que la presencia de infiltrados inflamatorios ricos en linfocitos indica la participación de estos infiltrados en la inmunopatogenia de la lesión renal en perros con CME (figura 17-20).

Figura 17. Glomerulopatía membranoproliferativa en perros infectados naturalmente con *E. Canis*.



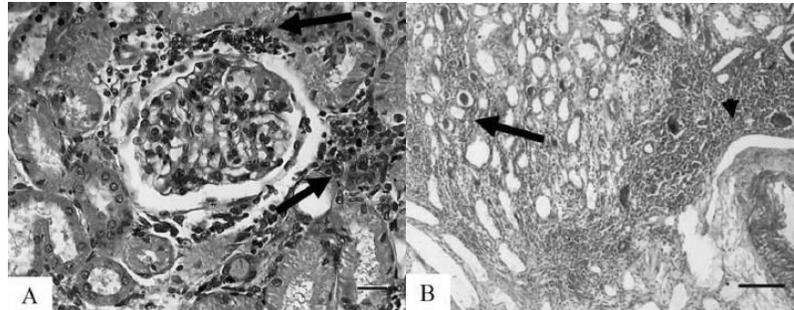
- (A) Membrana basal capilar glomerular y espesor de la matriz mesangial; (B) Glomérulo sin espesor de la membrana basal capilar glomerular. PAMS. Bar = 25 μ m.

Figura 18. Lesión glomerular en riñón de perros infectados naturalmente con *E. Canis*.



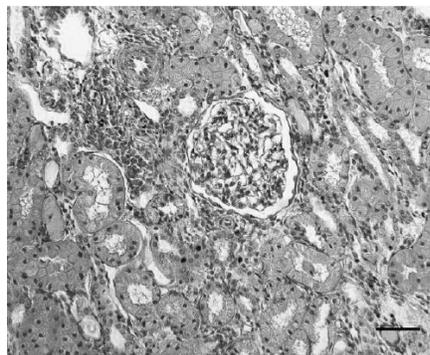
- (A) PGN. Hiper celularidad glomerular (H & E). Bar = 25 μ m. (B) glomérulo normal (H & E). Bar = 25 μ m. (C) Depósitos de proteínas en el espacio urinario (flecha) y esclerosis glomerular (punta de flecha) (PAS). Bar = 50 μ m. (D) PGN. Reducción del espacio urinario y el grosor de la matriz mesangial (PAS). Bar = 25 μ m.

Figura 19. Infiltrado inflamatorio en riñón de perros infectados naturalmente con *E. Canis*.



A) Infiltrado inflamatorio mononuclear periglomerular (flechas). ÉL. Bar = 25 μ m. (B) Infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial (flecha) y perivascular (punta de flecha). ÉL. Bar = 100 μ m.

Figura 20. Fibrosis intersticial en riñón de perros infectados naturalmente con *E. Canis*.



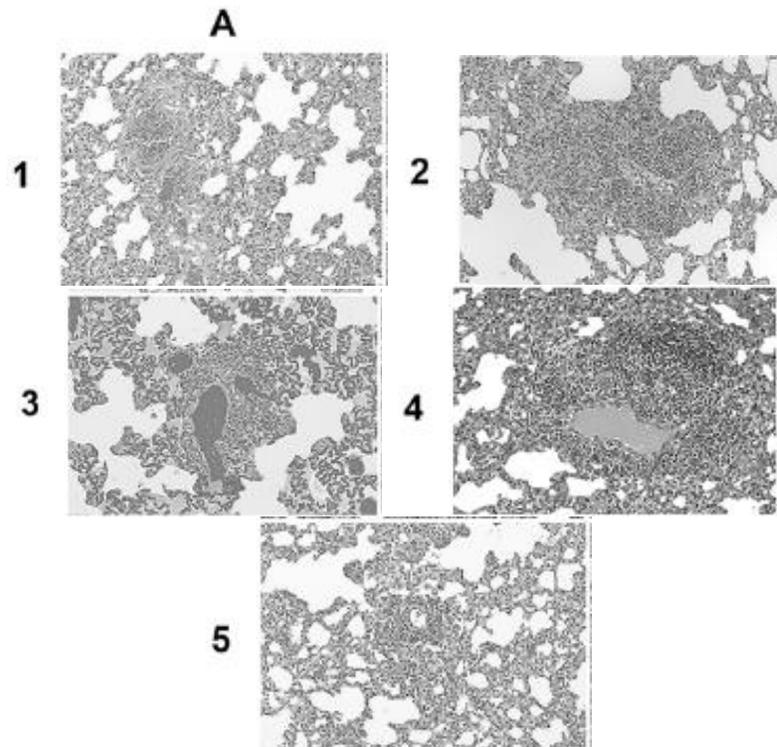
Presencia de fibrosis intersticial moderada en la región peritubular y periglomerular. Tricrómico de Masson Bar = 50 μ m.

5.3.5 Daños en Pulmón

Nair *et al.* (2016), cultivaron *in vitro* a *E. canis* y *E. chaffeensis*. Las bacterias cultivadas en la línea celular de macrófagos caninos DH82 presentaron un 80% de infectividad, realizaron observaciones histopatológicas de lesiones microscópicas en pulmón, los tejidos pulmonares de los perros infectados con *E. Canis* se

diseminaron a microgranulomas poco delineados o discretas. La inflamación se caracterizó por un número moderado a grande de infiltrados perivasculars de macrófagos y linfocitos en los pulmones de los perros infectados con *E. Canis* (figura 21).

Figura 21. Cambios histopatológicos en perros como resultado de infecciones.

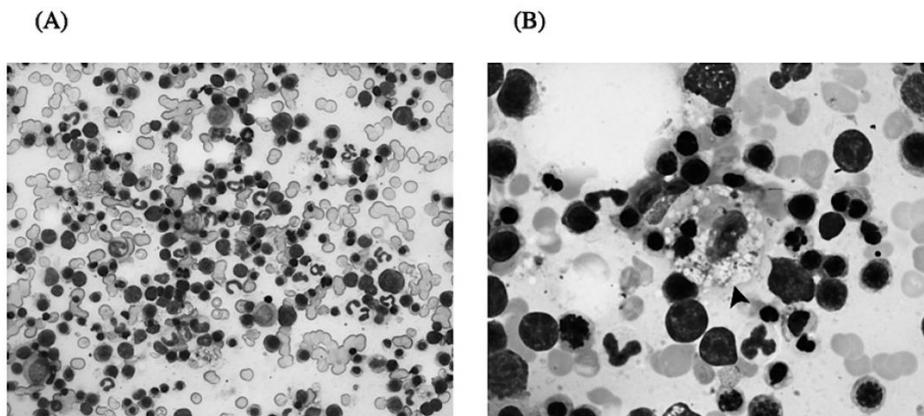


Las filas 1-5 representan muestras de tejido recogidas de controles, *E. Canis*, *E. chaffeensis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum*, perros infectados, respectivamente. A) Tejidos pulmonares que muestran infiltración perivascular de macrófagos y linfocitos con variación en el grado de inflamación entre los grupos infectados en comparación con los controles.

5.3.6. Daños en Cerebro

La investigación de Baba *et al.* (2012), fue conducida para determinar la causa de la pancitopenia en sus pacientes caninos, ellos realizaron la aspiración de médula ósea y la prueba serológica para saber si había infección por *E. Canis*. Los frotis de aspiración de médula ósea revelaron normoceluralidad con una relación mieloide a eritroide (0,17) claramente disminuida sin anormalidades morfológicas, lo que indica hiperplasia eritroidea (Figura 22A). Se observaron ocasionalmente células megacariocíticas. También se observó una mayor fagocitosis de los eritrocitos nucleados (Figura 22B). El examen microscópico no mostró inclusiones intracitoplásmicas en el aspirado de médula ósea o frotis de sangre periférica. La prueba serológica para *E. Canis* fue negativa (<1:25) (Monolis, Inc.).

Figura 22. Fotomicrografías de citología por aspiración de médula ósea (tinción de Hemacolor).

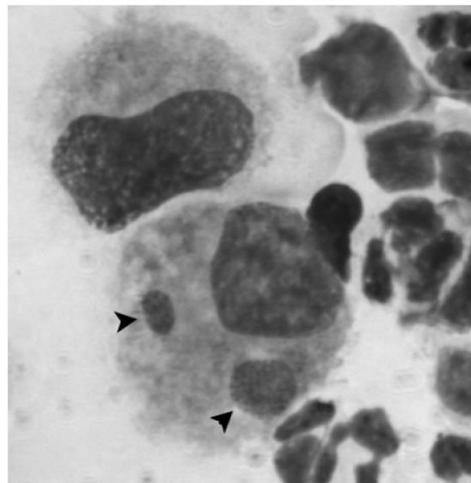


(A) hiperplasia eritroidea y (B) fagocitosis de eritrocitos nucleados (punta de flecha) fueron observados. Las inclusiones intracitoplásmicas no se encontraron en el aspirado de médula ósea.

Kaewmongkol *et al.* (2015) reportaron un caso de *Ehrlichia canis* en una hembra de la raza poodle, cuya bacteria fue detectada en fluidoespinal de un no trombocitopénico con meningoencefalitis por PCR de amplio rango. El examen

neurrológico reveló reacciones posturales deprimidas de la extremidad posterior izquierda. Se realizaron imágenes por resonancia magnética (IRM) del cerebro, aspiración de líquido cefalorraquídeo (LCR) y aspiración de médula ósea para determinar la causa de los signos neurrológicos, la anemia no regenerativa y la trombocitopenia. La RM del cerebro reveló hipertrofia y alta intensidad de señal en las imágenes ponderadas en T2 de las meninges, indicando meningitis. Las anomalías del LCR incluyeron xantocromía, aumento de los niveles de proteína (2,4 g/dl), pleocitosis (3,200/ μ l) e inclusiones intracitoplasmáticas (sospechosas como mórulas) en macrófagos infiltrados. Se sospechó infección por *E. Canis* basándose en inclusiones intracitoplasmáticas encontradas en células mononucleares en CSF (1:25, rango de referencia, <1:40). Para confirmar la infección por *E. Canis*, realizaron PCR anidada y análisis de secuencia utilizando muestras de aspirado de médula ósea y CSF (figura 23).

Figura 23. Fotomicrografía de citología del líquido cefalorraquídeo.



Se observaron inclusiones intracitoplasmáticas en forma de anillo redondeado (puntas de flecha) en células mononucleares de fluido cerebroespinal (tinción de Hemacolor, Merck, Darmstadt, Alemania).

Capítulo 6. Tratamientos para *Ehrlichia canis*

6.1. Terapia antimicrobiana de ehrlichiosis canina

Los signos de fase aguda suelen desaparecer sin tratamiento dentro de una a 4 semanas dando lugar a la fase subclínica.

Dentro de los fármacos eficaces para tratar esta patología, están las tetraciclinas. En términos generales, se sabe que si el tratamiento se administra antes de que los perros se encuentren en la fase aguda, los resultados de éste y su pronóstico serán más favorables. Harrus, Waner y Neer, (2007) señalaron que los perros que se encuentran en la fase crónica generalmente no responden al tratamiento debido a los cambios multisistémicos y a la mielosupresión severa de la enfermedad.

Otros fármacos efectivos en algunos países son la doxiciclina y la minociclina, estos son considerados como el tratamiento de elección, debido al mecanismo de acción del fármaco sobre las células, mecanismo esencial para la eliminación de la infección. Actualmente, la doxiciclina tiene las ventajas farmacológicas respecto a otros agentes, destacando una vida media más larga y mayor efecto a nivel del SNC respecto de cualquiera de las tetraciclinas u oxitetraciclina (Harrus *et al.*, 2007). Estos mismos investigadores han reportado en un estudio, la administración de doxiciclina (10 mg/kg/24 hora) durante 7 días para eliminar la *E. Canis* en 3 de 5 perros.

En otros estudios, se ha administrado doxiciclina a razón de 5mg/kg dos veces al día durante un intervalo de 10 a 14 días, resultando completamente eficaz en la eliminación de la *E. Canis*, cuando esta fue detectada a tiempo a través de PCR. Sin embargo, otros estudios con infecciones experimentales ya sean 16 a 23 o 28 días de tratamiento con doxiciclina fueron suficientes para borrar los organismos de todos los perros infectados. Después del tratamiento de perros con infección crónica, los resultados de la PCR se mantuvieron positivos en la sangre de los

perros y también en las garrapatas que se alimentaban de ellos (Harrus *et al.*, 2007).

En base los hallazgos anteriores respecto al tratamiento con doxiciclina, se asume que el periodo estándar de la terapia de doxiciclina en infecciones naturales ha oscilado entre 21 a 28 días, sugiriendo una dosis mínima terapéutica de 10 mg/kg al día durante 28 días.

Harrus *et al.* (2007), reportaron que en los pacientes caninos en fase aguda o crónica leve de la enfermedad, se produce una notable mejoría entre 24 a 48 horas después del inicio del tratamiento con tetraciclina. El recuento de plaquetas correspondientemente comienza a aumentar durante este tiempo y es por lo general en el rango de referencia de 10 a 14 días después del tratamiento. No habrá inmunidad permanente, y los perros pueden llegar a ser infectados con *E. Canis* después de un tratamiento anteriormente eficaz.

CONCLUSIÓN

La ehrlichiosis fue descubierta desde 1935 y nombrado en 1945 por el bacteriólogo Paul Ehrlich. Es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por bacterias intracelulares obligadas, gram negativas, cocoides, pleomórficas pequeñas que parasitan el citoplasma de los leucocitos, principalmente monocitos y macrófagos. Pertenecen al filum proteobacterias, orden rickettsiales, familia Anaplasmataceae, géneros: Ehrlichia, Anaplasma y Neorickettsia.

De gran relevancia debido a su potencial transmisión al humano y su prevalencia geográfica, la cual depende de la distribución de su vector *Rhipicephalus sanguineus*, teniendo mayor presencia en climas tropicales y subtropicales. Presente en los continentes de Asia, África, Europa y en América desde Estados Unidos hasta Argentina.

Ehrlichia canis, afecta a miembros de la familia canidae, con daños principalmente en sus sistemas hematopoyético, linfoide, hepático, renal, articular u ocular.

El periodo de infección varía de 8 a 20 días después de la mordedura de la garrapata o la transfusión sanguínea de un animal infectado y de ahí se replica en las células mononucleares de nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea, la enfermedad puede pasar a fase aguda, subclínica o crónica, esta última a falta de tratamiento adecuado, donde los signos clínicos están ausentes pero persisten los cambios hematológicos, así como los daños macroscópicos y microscópicos en órganos afectados.

Los signos más comunes asociados a esta enfermedad son fiebre, depresión, anorexia, vómitos y anemia, con tendencia al sangrado. Además encontramos secreción oculo-nasal, palidez de mucosas, así como hepatomegalia, linfadenomegalia, esplenomegalia y edema en extremidades y escroto, y en ocasiones signos oculares y respiratorios. En la fase crónica se pueden encontrar también algunos signos neurológicos e inclusive renales y reproductivos.

La diseminación de *Ehrlichia canis* se da mayormente en los órganos parenquimatosos; hígado, bazo y nódulos linfáticos, debido a que presentan una mayor población de fagocitos mononucleares. Aunque también produce vasculitis e inflamación perivascular en pulmón, riñón y meninges.

Debido a la gran variedad de signos clínicos inespecíficos su diagnóstico debe estar basado principalmente en una buena anamnesis e historia clínica, donde haya posibilidad de identificar la exposición previa del paciente a garrapatas vectores, utilizando como diagnósticos complementarios; las alteraciones hematológicas donde encontramos mayormente trombocitopenia, anemia (generalmente regenerativa) y leucopenia, el cultivo tisular realizado con sangre heparinizada o aspirados de medula ósea, las pruebas inmunológicas que determinan los niveles de anticuerpos (IgG o IgM), La inmunofluorescencia indirecta (IFI) donde podemos detectar anticuerpos tempranamente (mayormente IgA e IgM), La inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) la cual ha sido muy utilizada y recomendada puesto a su viabilidad para llevarse a cabo en el diagnóstico clínico, debida a su rapidez, eficiencia y costo accesible, El frotis sanguíneo utilizando la tinción de hematoxilina eosina y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del ADN de microorganismos en la sangre periférica de un animal infectado.

También es importante resaltar las petequias cutáneas debidas a la hemolisis intravascular y alteración plaquetaria, las cuales son un signo diagnóstico de la enfermedad.

Estudios de la patología hepática revelan diversos cambios histológicos en diferentes especies:

En estudios realizados en perros infectados con *Ehrlichia cani* se encontró infiltrado periportal de linfocitos y macrófagos, así como microgranulomas sinusoidales.

En pacientes con Ehrlichiosis monocítica humana se observó un aumento de la apoptosis hepática, elevación de las células de Kupffer infectadas y por tanto un aumento en las transaminasas, colangitis y colestasis.

En ratones utilizados como modelos de investigación para *Ehrlichia muris*, se generó proliferación hepatocítica secundaria a la evidente apoptosis de hepatocitos, así como aumento de las células de Kupffer y aumento de las células inflamatorias en hígado.

Como lesiones hepáticas macroscópicas se encontró de manera recurrente en diferentes casos de *Ehrlichia canis*; hipoecogenidad en hígado, ascitis y evidente hepatomegalia al utilizar ultrasonido como herramienta diagnóstica.

En el bazo se encontró de manera recurrente pero menos evidente esplenomegalia, congestión en perros infectados con *E. canis*.

Otros órganos que resultaron implicados en la infección de *E. canis* fueron riñón y pulmones.

Presentando una relevante glomerulonefritis membranoproliferativa en la totalidad de los casos de una investigación y glomerulonefritis proliferativa observada en algunos pacientes, donde el infiltrado predominante fue de linfocitos respecto a células plasmáticas.

En pulmones se hallaron microgranulomas e infiltrados perivasculares de macrófagos y linfocitos.

El tratamiento está basado principalmente en tetraciclina y doxiciclina, esta última a una dosis de 10 mg/kg al día, durante 10-14 días para erradicación de la bacteria y hasta 28 días en pacientes crónicos, es importante destacar que se observa una notable mejoría de 24-48 horas después de iniciado el tratamiento.

SUGERENCIAS

Es conveniente al momento de realizar un diagnóstico con signología inespecífica investigar de manera exhaustiva a la anamnesis la posibilidad de contacto con el vector *Rhiphicephalus sanguineus*, puesto a que es una enfermedad que comparte daños con otras enfermedades de frecuencia clínica.

Tener a la mano esta investigación sobre los daños hallados en órganos parenquimatosos nos permitira tener una comparativa en con otras infecciones además de comprender la naturaleza de la patogenia de *Ehrlichia cani* y así poder descartar de manera más contundente las enfermedades diferenciales.

LITERATURA CITADA

- Adrianzén J, Chávez A, Casas EC. (2003): Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Revista Investigaciones Veterinarias del Perú*, 14 (1):43-48.
- Aguirre E, Ayllon T, Sainz A, Amusatogui I, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F, Tesouro MA. (2009): Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*. *Veterinary journal*, 182(2):301-305.
- Alleman A, Chandrashekar M, Beall M, et al. (2006): Experimental inoculation of dogs with a human isolate (NY18) of *Anaplasma phagocytophilum* and demonstration of persistent infection following doxycycline therapy. *J Vet Intern Med.* 20:763
- Almazán C, González-Álvarez VH, Fernandez de Mera IG, Cabezas-Cruz A, Rodriguez-Martínez R, de la Fuente J. (2016): Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(2):276-283.
- Ayllón T, Tesouro MA, Sainz A. (2009): Serology, PCR and culture of *Ehrlichia* /*Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2):4-5.
- Baba K, Itamoto K, Amimoto A, Kitagawa K, Hiraoka H, Mizuno T, Sato H, Okuda M. (2012): *Ehrlichia canis* Infection in Two Dogs that Emigrated from Endemic Areas. *J. Vet. Med. Sci.*, 74(6):775-778.
- Baneth G. (2006): Infectious & parasitic diseases: canine ehrlichiosis – a silent killer. 31st World Small Animal Veterinary Congress, República Checa, 479-483.
- Beall MJ, Alleman AR, Breitschwerdt EB, Cohn LA, Couto CG, Dryden MW, Guptill LC, Iazbik C, Kania SA, Lathan P, Little SE, Roy A, Sayler KA, Stillman BA, Welles EG, Wolfson W, Yabsley MJ. (2012): Seroprevalence of *Ehrlichia*

- canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit Vectors*, 5:29.
- Beaufils J. (1997): Ehrlichiosis clinical aspects in dogs and cats. *Internacional forum on ticks and tick-borne disease, compedium on continuing education for the practicing veterinaria*, 19:57-61.
- Berelli ST, Walker DH. (2015): A Tick Vector Transmission Model of Monocytotropic Ehrlichiosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 212:968-977.
- Bosh GC. (2008): *La técnicas de investigación documental*. 12va Ed. Trillas, México.
- Breitschwerdt E. (2007): Patógenos bacterianos intracelulares obligados. En: *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. 166, sexta edición, 633-634, Elsevier Saunders.
- Breitschwerdt EB, Woody BJ, Zerbe CA, De Buyscher EV, Barta O. (1987): Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 1(1):2-9.
- Brockus C, Andreasen C. (2005): Eritrocitos. En: *Patología Clínica Veterinaria*. 1-52, Multimedica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España.
- Cadman HF, Kelly PJ, Matthewman LA. (1994): Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. *Veterinary Record*, 135(15):362.
- Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. (2009): Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23:1129-1141.
- Carrillo LM, Betancur S, Roldán D, Pérez TE, Galeano D, Loaiza ET, Giraldo CA. (2012): Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia spp.*, en caninos de Medellín (Colombia). *Rev. CES Med. Vet. Zootec.*, 7(2):38-46.

- Chandrashekar, R., Mainville, C.A., Beall, M.J., O'Connor, T., Eberts, M., Rick Alleman, Gaunt, S.D., Breitschwerdt E.B. (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. *American Journal of Veterinary research*. 71(12): 1443-1450.
- Chavera A, Viera F, Samamé H. (1982): Ehrlichiosis Canina en el Perú. *Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias*, Ica – Perú. Chávez-Calderón C. *Ehrlichia canis* en caninos y el tratamiento con doxiciclina. Tesina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Chávez Calderón, D. (2014): *Ehrlichia canis* en caninos y el tratamiento con doxiciclina. Tesina de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Codner EC, Farris-Smith LL. (1986): Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *I. Am. Med. Assoc.*, 189:47-50.
- Codner EC, Roberts RE, Ainsworth AG. (1985): Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*, 186:166-9.
- Cohen SB, Yabsley MJ, Freye JD, Dunlap BG, Rowland ME, Huang J, Dunn JR, Jones TF, Moncayo AC. (2010): Prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in ticks from Tennessee. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10(5):435-440.
- Cohn LA. (2003): Ehrlichiosis and related infections. *Vet. Clin. North Am. Small Animals Pract.*, 33(4):863-884.
- Cupp EW. (1991): Biology of ticks: Tick-transmitted diseases. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim Pract.*, 21(1):1-26.
- De Moraes H, Hoskins J, Pereira N, Labarthe N. (2004): Guidelines for diagnosis and management of dogs infected with *Ehrlichia* spp. *Clínica veterinaria*, 48(2):28-30.

- Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS, Richter P, Kimsey R, Madigan JE. (1995): Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and the human granulocytic ehrlichia. *J Clin Microbiol.*, 33:1098-1103.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SH, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. (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.
- Dumler JS, Walker DH. (2001): Tick-borne ehrlichioses: more of them, higher incidences, and greater clinical diversity. *Lancet Infect. Dis.*, 21-28.
- Eddlestone SM, Gaunt SD, Neer TM, Boudreaux CM, Gill A, Haschke E, Corstvet RE. (2007): PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase experimental infection. *Exp Parasitol.*, 115:205-10.
- Egenvall A, Lilliehook I, Bjoersdorff A, Engval LEO, Karlstam E, Artursson K, Heldtander M, Gunnarsson A. (2000): Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet. Rec.*, 146:186-190.
- Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjöersdorff AI. (1997): Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec.*, 140:222–226.
- Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. (2013): First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comparative immunology microbiology and infectious diseases*, 169-173.
- Elias E. (1992): Diagnosis of *ehrlichiosis* from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. Canis*. *Journal of Small Animal Practice*, 33(11):540 – 543.

- Fermin L. (2008): Citología del frotis sanguíneo. En: Atlas de citología clínica del perro y el gato. Ed. Diseño y Comunicación Servet S.L., 322-362, SERVET, Navarra, España.
- Frank JR, Breitschwerdt EB. (1999): A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. J. Vet. Intern. Med., 13:194–201.
- Ghafar MW, Amer SA. (2012): Prevalence and first molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic anaplasmosis, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt. J. Adv. Res., 3:189-194.
- Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurtti TJ, Munderloh UG. (1996): Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. N. Engl. J. Med., 334:209-215.
- Greene C. (2000): Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos. Segunda edición, McGraw-Hill Interamericana, México.
- Greene R. (1997): Ehrlichiosis canina implicaciones de factores Humorales. En: Veterinaria de Pequeños Animales. 12va Ed., 317–320, McGraw-Hill. Interamericana, México
- Greig B, Armstrong J. (2006): Canine granulocytotropic anaplasmosis. En: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3 ed., 223, ed, por Greene C., Saunders, Philadelphia.
- Harrus S, Waner T, Bark H. (1997): Canine monocytic Ehrlichiosis Update. Com. Cont. Ed. Pac. Vet. 431-444.
- Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AWCA. (1999): Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol., 37(9):2745-2749
- Harrus S, Waner T, Neer M. (2007): Ehrlichia and Anaplasma infections. En: Infectious diseases of the dog and cat. 26, Cuarta edición, 227-238, ELSEVIER, Georgia EE. UU.

- Harrus S, Warner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Park H. (1998): Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.*, 36(1):73-76
- Hibler SC, Hoskins JD, Greene CE. (1986): Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compendium Continuing Education Practice Veterinary*, 8:106-114.
- Higa NAC, Zacarias MR, Tinucci CM, Rogério AM, Divan BC, (2008): Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological, and molecular aspects. *Ciencia Rural*, 38(3):766-770.
- Hinrichsen VL, Whitworth UG, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Mather TN. (2001): Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(7):1092-1097.
- Huxsoll DL, Hildebrandt PK, Nims RM, Amyx HL, Ferguson JA. (1970): Epizootiology of tropical canine pancytopenia. *Journal of wildlife diseases*, 6(4): 220-225.
- Inter-médica, Buenos Aires.
- JD. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales*. 1182-1186, Interamericana-McGraw-Hill. Nueva York.
- Johnson EM, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Crow DW, Kocan KM. (1998): Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, 74(2):277-288.
- Jongejan F, Uilenberg G. (2004): The Global importance of ticks. *Parasitology*, 129:1-12.
- Kaewmongkol G, Maneesaay P, Suwanna N, Tiraphut B, Krajarngjang T, Chouybumrung A, Kaewmongkol S, Sirinarumitr T, Jittapalapong S, Fenwick SG. (2015): First Detection of *Ehrlichia canis* in Cerebrospinal Fluid From a

- Nonthrombocytopenic Dog with Meningoencephalitis By Broad-Range PCR. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30: 255-259.
- Kakoma I, Carson CA, Ristic M, Stephenson EM, Hildebrandt PK, Huxsoll DL. (1978): Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infection and immunity*, 20(1):242-247.
- Kern TJ. (1994): Manifestaciones oculares de enfermedad sistémica. En: Kirk RW, Bonagura
- Knowles T, Allegan A, Sorenson H, Marciano D, Breitschwerdt E, Aarhus S, Barbet A, Bélanger M. (2003): Characterization of the Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its Application for Serodiagnosis of Ehrlichiosis. *American Society for Microbiology*, 10(4):520-524.
- Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. (2008): Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 22:1289–1295.
- Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. (2008): Clinical Features of Canine Granulocytic Anaplasmosis in 18 Naturally Infected Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6):1289-1295.
- Lappin M, Turnwald G. (2004): Microbiología y enfermedades infecciosas. En: *Diagnostico Clinicopatológico Practico en Pequeños Animales*. Cuarta Edición, Ed. por Willard M., Tvedten H. 333-357, Intermedica, Buenos Aires, Argentina.
- Lee EH, Rikihisa Y. (1997): Anti-*Ehrlichia chaffeensis* antibody complexed with *E. chaffeensis* induces potent proinflammatory cytokine mRNA expression in human monocytes through sustained reduction of I κ B-alpha and activation of NF- κ B. *Infect Immun.*, 65:2890-2897.
- León A, Demedio J, Márquez M, Castillo E, Perera A, Zuaznaba O, Caníbal J, González B, Reynaldo L, Vega N, Blanco D, Ronda M, Peña A, Seija V.

- (2008): Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de la Habana. Revista Electrónica de Clínica Veterinaria. 3(5):1-22
- Lewis D. (2012): Trombocitopenia Inmunomediada. En: Manual de Hematología y transfusión en pequeños animales. Trad. por Merchan M., 303-312, Ediciones S, Barcelona, España.
- López J, Rivera M, Concha J, Gatica S, Loeffeholz M, Barriga O. (2003): Serologic Evidence for Human Ehrlichiosis in Chile. Rev. Med. Chile. 13(1):67-70.
- Madewell B, Gribble D. (1982): Infection in two dogs with an agent resembling Ehrlichia equi. J. Am. Vet Med Assoc., 180:512–514.
- McBride J, Corstvet R, Breitschwerdt E, Walter D. (2001): Immunodiagnosis of Ehrlichia canis Injection with Recombinant Proteins. Journal of Clinical Microbiology, 39(4):315-322.
- McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Boudreaux C, Guedry T, Walker DH. (2003): Kinetics of antibody response to Ehrlichia canis immunoreactive proteins. Infection Immun., 71: 2516–2524.
- Messick JB, Rikihisa Y. (1993): Characterization of Ehrlichia risticii binding, internalization, and proliferation in host cells by flow cytometry, Infection and immunity, 61(9):3803-3810.
- Movilla R, Altet L, Serrano L, Tabar MD, Roura X. (2017): Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. Parasites & Vectors, 10(131):1-8.
- Munderloh UG, Blouin EF, Kocan KM, Ge NL, Edwards WL, Kurtti TJ. (1996): Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. J. Med Entomol., 33:656-664.
- Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL. (2004): Infection of endothelial cells with Anaplasma marginale and A. phagocytophilum. Vet Microbiol., 101(1):53–64.

- Murphy K, Papasouliotis K. (2012): Diagnóstico de enfermedades protozoarias y de enfermedades transmitidas por artropodos. En: Manual de Diagnóstico de laboratorio en Pequeños Animales. Ed. por Villiers E, Blackwood L., 597-608, Ediciones S, Barcelona, España.
- Mylonakis ME., Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS. (2004). Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. Journal of the American Animal Hospital Association, 40(3):174-184.
- Nair ADS, Cheng C, Ganta CK, Sanderson MW, Alleman AR, Munderloh UG, Ganta RM. (2016): Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. PLoS ONE, 11(2):1-21
- Nakaghil ACH, Machadol RZ, Costall MT, Andrél MR, Baldani CD, (2008): Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciencia Rural*, 38(3):766-770.
- Neer T. (2000): Ehrlichiosis Monocítica y Granulocítica Canina. En: Enfermedades Infecciosas en perros. Ed. por Greene C., 153-163, McGraw-Hill Interamericana, México.
- Neer TM, Harrus S. (2006): Canine Monocytotropic Ehrlichiosis (*E. Canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, and *N. risticii* Infections). Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and *Wolbachia* Infection. En: Infectious Diseases of the dog and cat. Third ed., 203-217, ed. por Greene CE, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Nelson RW, Couto CG. (1995): Medicina interna en animales pequeños. 899- 902.
- Nutt AK, Raufman JP. (1998): Gastrointestinal and hepatic manifestations of human ehrlichiosis: 8 cases and a review of the literature. Dig Dis., 17:37-43.
- Nyindo M, Huxsoll DL, Ristic M, Kakoma I, Brown JL, Carson CA, Stephenson EH. (1980): Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd

- Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 41(2):250-254.
- Nyindo M, Kakoma I, Hansen R. (1991): Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of protein immunoblot. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1225-1230.
- Nyindo MB, Ristic M, Huxsoll DL, Smith AR. (1971): Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 32(11):1651-1658.
- Nyland, T.G., Mattoon S.J. (2002): *Small Animal Diagnostic Ultrasound (Second Edition)*
- Olano JP, Walker DH. (2002): Human ehrlichioses. *Med. Clin. North Am.* 86:375-392.
- Parmar JH, Bhartiya S, Venkatesh KV. (2012): Quantification of metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions using elementary mode analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39(6):927-941.
- Parnell N. (2004): Ehrlichiosis Canina. En: *Clínica de Pequeños Animales*. 1122-1124, Ed. Por Morgan R., El Servier. España.
- Popov VL, Han VC, Chen S-M, Dumler JS, Feng H-M, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. (1998): Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med Microbiol.*, 47:235-251.
- Prescott L, Harley J, Klelín D. (1999): *Microbiología*. 4 Ed., 475, McGraw-hill Interamericana España.
- Quijada J, García M, Bethencourt A, Medina O, Vivas I, Pérez A, Garcia H. (2012): Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de Venezuela. *REDVET*, 13(8):1-16.
- Reardon MJ, Pierce KR. (1981): Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Veterinary pathology*, 18(1):48-61.

- Rikihisa Y, Kawahara M, Wen B, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, Suto C, Shibata S, Futohashi M. (1997): Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J. Clin. Microbiol.*, 35:823-829.
- Rikihisa Y. (1991): The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4(3):286–308.
- Rikisha Y, Ewing S, Fox J, Siregar A, Pasariba F, Malole M. (1992): Analysis of *Ehrlichia canis* and canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *Journal of clinical Microbiology*, 30:143-148.
- Rivas V, Morales D, Saenz M, Bonilla J. (2010): Hallazgo de Ehrlichiosis canina causada por *E. Canis* en una Comunidad del Municipio de León, Nicaragua *REDVET*, 11(3):1-10.
- Rodriguez-Vivas R, Albornoz R, Bolio G. (2004): *Ehrlichia canis* in Dogs in Yucatán, Mexico. Seroprevalence, Prevalence of Infection and Associated factors. *Veterinary Parasitology*, 127(1):75-9.
- Romero LE, Meneses AI, Salazar L, Jiménez M, Romero JJ, Aguiar DM, Labruna MB, Dolz G. (2011): First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res. Vet. Sc.*, 91:95-97.
- Sainz A, Amusatague I, Rodríguez F, Tesouro M. (2000): Las Ehrlichiosis en el Perro: Presente y futuro. *Profesión Veterinaria*, 12(47):22-28.
- Sainz A, Delgado S, Amusatague I, Tesouro MA, Cármenes P. (1996): Seroprevalence of canine Ehrlichiosis in Castilla-León (NW Spain). *Prev. Vet. Med.*, 29:1–7.
- Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano Gallego L. (2015): Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(75):2-20.
- Saito TS, Thirumalapura NR, Shelite TR, Rockx-Brouwer D, Popov VL, Walker DH. (2015): An Animal Model of a Newly Emerging Human Ehrlichiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 211: 452-461.

- Sarma K, Mondal DB, Saravanan M. (2014): Ultrasonographic changes in dogs naturally infected with tick borne intracellular diseases. *Journal of parasitic diseases*, 40(2):248-251.
- Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. (2001): Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.*, 17:74-80.
- Silva LS, Pinho FA, Prianti MG, Braga JFV, Pires LV, França SA, Silva SMMS. (2016): Renal histopathological changes in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 9(1):2-15.
- Smith AES, Dumler JS. (2003): Hepatic Pathology in Human Monocytic Ehrlichiosis: *Ehrlichia chaffeensis* Infection. *American Society for Clinical Pathology*, 119:859-865.
- Sodikoff H. (2001): Pruebas Diagnósticas y de Laboratorio en las Enfermedades de Pequeños Animales. 3 Ed., 594, Elsevier, Madrid, España.
- Stiles J. (2000): Canine rickettsial infections, *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. 30(5):1135-1149.
- Troy GC, Forrester SD. (2006): Canine ehrlichiosis. En: GREENE CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3 ed., 404-418, Saunders, Philadelphia.
- Villanueva K. (2014): Alteraciones patológicas en análisis clínicos de *Canis familiaris* con ehrlichiosis diagnosticados mediante inmunocromatografía, en el distrito de Trujillo-2014. Tesis, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo – Perú.
- Villers E. (2012): Alteraciones de los eritrocitos. En: *Manual de Diagnóstico de laboratorio en Pequeños Animales*. Ed. por Villiers E, Blackwood L., 47-81, Ediciones S, Barcelona, España.
- Walker D. (2009): Frotis de sangre periférica. En: *Diagnostico citológico y hematológico del perro y el gato*. 3 ed., 387-418, Trad. por Montes S, Matellanes R, Soto A., ELSEVIER, Barcelona, España.

- Walser-Reinhardt L, Matheis F, Spiess B. (2012): Direct detection of *Ehrlichia canis* by PCR in the conjunctiva of a dog with bilateral anterior uveitis. AGRIS, 149-152.
- Waner T, Harrus S. (2000): Ehrlichiosis monocitica canina. (http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/waner_es/ivis.pdf f,journals, (28 de Enero 2018).
- Weiss D, Tvedten H. (2004): Trastornos eritrocitarios. En: Diagnóstico Clinicopatológico Práctico en los Pequeños animales. 4 ed., 39-63, Trad. por Hure A., Intermedica, Buenos Aires, Argentina.
- Woldehiwet Z, Horrocks BK, Scaife H, Ross G, Munderloh UG, Brown K, Edwards SW, Hart CA. (2002): Cultivation of an ovine strain of *Ehrlichia phagocytophila* in tick cell cultures. J Comp Pathol., 127(2-3):142-9.
- Woldehiwet Z, Horrocks BK. (2005): Antigenicity of ovine strains of *Anaplasma phagocytophilum* grown in tick cells and ovine granulocytes. J Comp Pathol., 123(4):322-8.
- Woody BJ, Hoskins JD. (1991): Ehrlichial diseases of dogs. The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice, 21(1):75-98.