

1-1-2018

## Alteraciones oculares y su relación con los hallazgos hematológicos en caninos positivos a Ehrlichia canis

Mónica Yamile Padilla Barreto  
*Universidad de La Salle, Bogotá*

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/maest\\_ciencias\\_veterinarias](https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias)

---

### Citación recomendada

Padilla Barreto, M. Y. (2018). Alteraciones oculares y su relación con los hallazgos hematológicos en caninos positivos a Ehrlichia canis. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/maest\\_ciencias\\_veterinarias/76](https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/76)

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



ALTERACIONES OCULARES Y SU RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS  
HEMATOLÓGICOS EN CANINOS POSITIVOS A *Ehrlichia canis*

Trabajo de Grado

MÓNICA YAMILE PADILLA BARRETO

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

Magister en Ciencias Veterinarias

Bogotá, Colombia

2018

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



ALTERACIONES OCULARES Y SU RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS  
HEMATOLÓGICOS EN CANINOS POSITIVOS A *Ehrlichia canis*

Trabajo de Grado

MÓNICA YAMILE PADILLA BARRETO

76142203

Directora

DUNIA YISELA TRUJILLO PISO, M.V.Z., M.Sc., PhD (C)

Bogotá, Colombia

2018

## APROBACIÓN

DIRECTORA

---

Dunia Yisela Trujillo Piso

JURADO

---

Miguel Ladino

JURADO

---

Frank Suárez

JURADO

---

Mauricio Merizalde

## DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Rector	Hno. Alberto Prada Sanmiguel
Vicerrector Académico	Dra. Carmen Amalia Camacho
Vicerrector De Investigación Y Transferencia	Dr. Luis Fernando Ramírez Hernández
Vicerrector De Promoción Y Desarrollo Humano	Hno. Diego Andrés Mora Arenas
Vicerrector Administrativo	Dr. Carlos Eduardo Navarrete Sánchez
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias	Hno. Ariosto Ardila Silva
Secretario Académico	Dr. Alejandro Tobón González
Director De Posgrados	Dr. Fernando Nassar Montoya
Asistente Académica de Medicina Veterinaria	Dra. Clara Stefany Romero

## COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por ser mi guía y por darme la fuerza y la persistencia para lograr todas mis metas, por bendecir mi vida con todo lo que he necesitado.

A mis padres Gustavo y Blanca Nieves, por haber hecho de mi la persona que soy en la actualidad, me formaron con estrictas reglas y algunas libertades y gracias a ello nunca he abandonado el camino hacia mis sueños; gracias por motivarme constantemente para alcanzar mis metas, sin su ayuda este sueño no sería una realidad.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su apoyo contribuyeron al desarrollo del presente trabajo, en especial a la Dra. Dunia Yisela Trujillo Piso quien es la directora de esta investigación, a quien le agradezco su acompañamiento y su tiempo, pero sobre todo la motivación y la orientación recibida a lo largo de estos meses, gracias por creer en mi proceso, gracias por compartirme un poco de su sabiduría, ha sido usted artífice importante de mi formación como profesional.

A la Universidad Cooperativa de Colombia y a la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por facilitar el desarrollo de esta investigación. Especial agradecimiento a la Dra. María del Pilar Sánchez Bonilla y al Dr. Fernely Plazas, docentes de esta facultad, por brindarme sus conocimientos y su camaradería, hicieron de este proceso una experiencia muy grata.

Finalmente agradezco la comprensión, paciencia y preocupación de mis familiares, amigos y compañeros de trabajo, a todos ellos muchas gracias.

## RESUMEN

La Ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial y su principal agente causal es una bacteria intracelular obligada, llamada *Ehrlichia canis*. Esta patología se presenta con mayor frecuencia en zonas templadas y áreas tropicales, debido a la presencia de su vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. *E. canis* se considera una enfermedad multisistémica y por esto puede producir gran variedad de signos clínicos, que van desde algunos clínicamente inaparentes, hasta signos muy graves. Alteraciones hematológicas son frecuentes en pacientes con ehrlichiosis: la anemia y la trombocitopenia prevalecen. Afecciones oculares también son reportadas y se destacan principalmente uveitis anterior y panuveitis, además de afecciones de tipo hemorrágico que desencadenan pérdida parcial o total de la visión de los pacientes. Debido a la variedad de signos clínicos oculares y alteraciones hematológicas que presentan los pacientes infectados con *E. canis* el presente estudio tuvo como objetivo identificar asociaciones entre las lesiones oculares y los trastornos hematológicos, para así establecer implicaciones pronósticas de los cambios hematológicos en la salud ocular de los perros infectados. 120 caninos de la ciudad de Ibagué con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis fueron muestreados en la presente investigación y estos fueron sometidos inicialmente a una prueba serológica rápida para *E. canis* y *Anaplasma spp.* En 70 de estos pacientes se identificaron anticuerpos contra *E. canis* y la infección fue confirmada mediante PCR en tiempo real en 39 de ellos. Hemograma, frotis de sangre periférica, extendido de capa blanca y examen oftalmológico completo, fue realizado en estos pacientes. Acorde a los resultados del cuadro hemático los pacientes fueron divididos en 3 grupos: grupo 1 (n=4): Anemia y trombocitopenia;



Grupo 2 (n=22): Trombocitopenia y grupo 3 (n=13): sin alteración hematológica. Trombocitopenia fue el principal hallazgo hematológico encontrado y las afecciones oculares más frecuentes fueron: uveítis, hiperemia conjuntival, precipitados queráticos, edema de córnea y edema perivascular. Glaucoma, hemorragias y desprendimientos retinianos también fueron encontrados. Las alteraciones oculares fueron clasificadas como leves o severas para establecer el compromiso oftalmológico para cada grupo, encontrando que las alteraciones severas predominan en los grupos 1 y 2 sin existir diferencias significativas entre ellos, pero estos si se diferencian del grupo 3 ( $P=0.0070$ ), el cual presentó en su mayoría lesiones de tipo leve o ausentes, por lo cual se considera que la severidad de las lesiones está asociada con la trombocitopenia principalmente y puede ser agravada por la anemia. Los cambios en la línea blanca no tienen asociación directa con las lesiones oculares. La cantidad de copias genéticas por microlitro de muestra obtenidas de la PCR cuantitativa, también se contrastaron con los diferentes hallazgos oculares, pero no existe relación entre estos. Se concluye que la trombocitopenia en los caninos infectados con *E. canis*, incluidos en este estudio, está asociada con la gravedad de las lesiones oculares, por lo tanto, este parámetro puede ser tenido en cuenta como indicador pronóstico y que la uveítis es la primera manifestación ocular de la ehrlichiosis canina.

Palabras clave: Uveitis, Trombocitopenia, Hemorragia de retina, Desprendimiento de retina, Presión intraocular.

## ABSTRACT

Canine Ehrlichiosis is a disease of worldwide distribution and its main causal agent is an intracellular bacterium named *Ehrlichia canis*. This pathology occurs most frequently in warm zones and tropical areas due to the presence of its vector, the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *E. canis* is multisystemic and therefore it can produce a variety of clinical signs, ranging from some clinically inapparent to very serious signs. Hematological alterations frequent in patients with ehrlichiosis, are anemia and thrombocytopenia. Ocular diseases are also frequently found in these canines, mainly anterior uveitis and panuveitis also hemorrhagic alterations may also occur which lead to partial or total loss of vision. Due to the variety of clinical ocular signs and hematologic alterations presented by patients infected with *E. canis*, the present study aimed to identify associations between ocular lesions and hematological disorders, in order to study the prognostic implications of hematological changes in the eye health of infected dogs. 120 canines from Ibagué city, with clinical signs compatible with ehrlichiosis, were sampled in the present investigation and these were initially subjected to a quick serological test for *E. canis* and *Anaplasma spp*. In 70 of these patients, antibodies against *E. canis* were identified and the infection was confirmed by real-time PCR in 39 of them. Hemogram, peripheral blood smear, white layer smear and complete ophthalmological examination were performed on these patients. According to the results of the blood picture, the patients were divided into 3 groups: group 1 (n=4): anemia and thrombocytopenia; group 2 (n=22): thrombocytopenia and group 3 (n=13): without hematological alteration. Thrombocytopenia was the main hematological finding and the most frequent ocular lesions were conjunctival

hyperemia, keratic precipitates, corneal edema and perivascular edema. Glaucoma, hemorrhages and retinal detachments were also found. Eye injuries were classified as mild or severe to establish the ophthalmological commitment for each group, finding that severe lesions predominate in groups 1 and 2 without significant differences between them, but these do differ from group 3 ( $P = 0.0070$ ), which presented mostly mild or absent lesions. Accordingly, it is inferred that the severity of the lesions is associated with thrombocytopenia, and can worsen with anemia. Changes in the white line have no direct association with eye injuries. The number of genetic copies per microliter of the sample obtained from the quantitative PCR were also contrasted with the different ocular findings, but there is no relationship between them. It is concluded that thrombocytopenia in canines infected with *Ehrlichia canis* included in this study is associated with the severity of ocular lesions, therefore, this parameter can be taken into account as a prognostic indicator of ocular health in this type of patients and that uveitis is the first ocular manifestation of canine ehrlichiosis.

Key words: Uveitis, Thrombocytopenia, Retinal hemorrhage, Retinal detachment, Intraocular pressure.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema y justificación	1
1.2 Objetivo general y específicos	4
1.3 Hipótesis general del proyecto	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 <i>Ehrlichia spp</i>	6
2.2 Interacción huésped - Patógeno	8
2.3 Proteínas inmunorreactivas de <i>Ehrlichia spp</i>	9
2.3.1 Proteínas con repetición en tándem (TRP)	9
2.3.2 Proteínas con repeticiones de anquirina	10
2.4 Sistemas de secreción	10
2.5 Inmunopatogenia	11
2.5.1 Patogenia de las lesiones oculares	22
2.6 Alteraciones hematológicas	24
2.7 Hallazgos oculares	26
2.8 Diagnóstico	28
2.8.1 Citología para detección de Mórulas	28
2.8.2 Serología	29
2.8.3 Diagnóstico Molecular	31
3. METODOLOGÍA	34
3.1 Localización	34
3.2 Población y muestra	34
3.3 Métodos y procedimientos	36
3.4 Diseño y análisis estadístico	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Prueba rápida (Anigen Rapid® E. canis/Anaplasma Ab)	40
4.2 Selección de pacientes	41
4.2.1 Frotis de sangre periférica.	41
4.2.2 PCR en tiempo real (RT-PCR).	41

4.2.3. Pacientes Negativos a <i>Ehrlichia spp.</i>	42
4.2.3.1. Hemograma.	42
4.2.3.2. Examen oftalmológico.	42
4.2.4. Pacientes positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	43
4.2.4.1. Hemograma.	43
4.2.4.2. Examen oftalmológico	44
4.3 Relación entre las alteraciones oculares y hematológicas	45
4.3.1. Grupos de estudio.	45
4.3.2. Comparación de las variables hematológicas en los grupos de estudio	46
4.3.2.1. Recuento plaquetario.	46
4.3.2.2. Hematocrito.	47
4.3.2.3. Recuento leucocitario.	47
4.3.2.4. Número de copias / $\mu$ l del gen <i>TraG</i> .	48
4.3.3. Clasificación de las lesiones oculares.	48
4.3.4. PIO y el TLS en los grupos de estudio.	51
4.3.5. Lesiones oculares específicas en los grupos de estudio.	53
4.3.6. Severidad de las lesiones oculares en los grupos de estudio.	54
4.3.7. Relación entre la PIO y las variables hematológicas.	56
5. DISCUSIÓN	59
6. CONCLUSIONES	75
7. LISTA DE REFERENCIAS	78
8. ANEXOS	104

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes	35
Tabla 2. Información general de los grupos de estudio y valores hematológicos promedio.	46
Tabla 3. Clasificación de las lesiones oculares	48
Tabla 4. Resultados prueba de Chi-cuadrado para las lesiones oculares encontradas en los grupos	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores relativos promedio de leucogramas de caninos positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	43
Figura 2. Frecuencia de lesiones oculares en pacientes positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	45
Figura 3. Recuento leucocitario en cada uno de los grupos de estudio.	48
Figura 4. Lesiones oculares en el grupo 1 (Anemia y Trombocitopenia)	49
Figura 5. Lesiones oculares en el grupo 2 (Trombocitopenia)	50
Figura 6. Lesiones oculares en el grupo 3 (sin alteración hematológica)	51
Figura 7. Presión intraocular (PIO) promedio en los tres grupos de estudio	52
Figura 8. Severidad de las lesiones oculares vs hallazgos hematológicos en pacientes positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	55
Figura 9. Presión intraocular vs plaquetas en pacientes positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	56
Figura 10. Presión intraocular vs hematocrito en pacientes positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	57
Figura 11. Presión intraocular vs recuento leucocitario en pacientes positivos a <i>Ehrlichia spp.</i>	58

## LISTA DE SIGLAS

Sigla	Inglés	Español
ADA	Adenosine Deaminase	Adenosina Desaminasa
Ank	Ankyrin	Anquirina
APA	Antiplatelet Antibody	Anticuerpo Antiplaquetario
CME	Canine Monocytic Ehrlichiosis	Ehrlichiosis Monocítica Canina
EEA	Early Endosomal Antigen	Antígeno Endosómico Temprano
FIMP	Inhibitor Factor of Platelet Migration	Factor Inhibidor de Migración Plaquetaria
Gp	Glycoprotein	Glicoproteína
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	Glicosilfosfatidilinositol
Hto	Hematocrit	Hematocrito
IFA	Immunofluorescence	Inmunofluorescencia
IFN	Interferon	Interferon
IgG	Immunoglobulin G	Inmunoglobulina G
IgM	Immunoglobulin M	Inmunoglobulina M
IL	Interleukin / Interleukin	Interleucina / Interleuquina
LPS	Lipopolysaccharides	Lipopolisacaridos
MHC	Major histocompatibility complex	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MnSOD	Superoxide Manganese Dismutase	Superóxido Dismutasa de Manganeso
NK	Natural Killer	Célula asesina
NOD	Nucleotide-linked oligomerization domain	Dominio de oligomerización unido a nucleótido
PCR	Polymerase chain reaction	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIO	Intraocular pressure	Presión intraocular
PLT	Platelets	Plaquetas
PMAPs	Molecular patterns associated with pathogens	Patrones moleculares asociados a patógenos
ROS	Reactive oxygen species	Especies reactivas de oxígeno



RT PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
T4SS	Type 4 Secretion System	Sistema de Secreción Tipo 4
TfR	Transferrin receptor	Receptor de transferrina
TH1	Lymphocyte T helper type 1	Linfocito T ayudador tipo 1
TH2	Lymphocyte T helper type 2	Linfocito T ayudador tipo 2
TLS	Schirmer's Lacrimal Test	Test Lacrimal de Schirmer
TLRs	Toll-like receptors	Receptores tipo Toll
TNF	Tumor Necrosis Factor	Factor de Necrosis Tumoral
TRP	Tandem Repetition Protein	Proteína con Repetición en Tándem

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Formato examen oftalmológico	104
---------------------------------------	-----

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Planteamiento del problema y justificación

La ehrlichiosis canina es considerada una enfermedad infecciosa de gran importancia en todo el mundo (Harrus & Waner, 2011), cuyo principal agente causal es una rickettsia pleomórfica, cocoide de tipo gram negativo, aeróbica e intracelular obligada llamada *Ehrlichia canis* (Rikihisa, 1991). La enfermedad se transmite por medio de la saliva de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Groves, Dennis, & Amyx, 1975) o por transfusiones sanguíneas de un perro infectado a otro susceptible (Reine, 2004). Este microorganismo se multiplica en las células mononucleares circulantes, las cuales, una vez infectadas se adhieren al endotelio vascular, produciendo una vasculitis y una infección en el tejido subendotelial, causante de gran parte del cuadro clínico del animal (Breitschwerdt, Woody, Zerbe, De Buysscher, & Barta, 1987; Lopez, Castillo, Muñoz, & Hildebrandt, 1999).

La ehrlichiosis canina ha sido reportada en todos los continentes, pero se presenta con mayor frecuencia en zonas templadas, áreas tropicales y subtropicales donde es mayor la presencia de su vector *Rhipicephalus sanguineus* (Manna et al., 2004). Dentro de los ectoparásitos que circulan en este país, la mayor parte pertenecen a la familia Ixodidae, particularmente al género *Rhipicephalus* y sus especies *R. sanguineus* y *R. (B.) microplus* (Paternina, Diaz, Paternina Gómez, & Bejarano, 2009) y gracias a ello *E. canis* ha encontrado las condiciones óptimas para

distribuirse por diversas regiones del territorio nacional; por ejemplo en la ciudad de Cali se cuenta con una prevalencia del 68,75% (Triviño et al., 2013); Medellín por su parte reporta una prevalencia de 24,8% (Cartagena, Ríos, & Cardona, 2015), en Barranquilla un 28% (Badillo, Díaz, Orozco, & Lavallo, 2017) y en la ciudad de Ibagué hasta la fecha no se reportan datos de prevalencia pero si se cuenta con una seroprevalencia del 31,66% (Hermógenes Salazar, Buriticá, Echeverry, & Barbosa, 2014). La prevalencia global para Colombia es de 40,6% y la seroprevalencia del 82,4% (Mccown, Monterroso, & Cardona, 2015; Vargas-Hernández et al., 2012a).

La infección con *E. canis* da como resultado un amplio espectro de signos clínicos que van desde algunos clínicamente inaparentes, hasta signos muy graves y con complicaciones que varían dependiendo de la raza, la dosis del patógeno transmitida durante la alimentación de las garrapatas, las respuestas inmunológicas específicas de cada perro y el estado de salud en general que poseía el canino antes de la infección (Little, 2010).

Las alteraciones hematológicas más comunes en los caninos infectados incluyen trombocitopenia, anemia y leucopenia (Das & Konar, 2013), sin embargo la trombocitopenia es el hallazgo que ha sido reportado con más frecuencia a lo largo del tiempo en estos pacientes en todo el mundo (Badillo et al., 2017; G Baneth, Waner, Koplak, Weinstein, & Keysary, 1996; Frank & Breitschwerdt, 1999; González, Rojas, Pulido-Medellín, & García, 2013; Kaewmongkol et al., 2017; Silva-molano, Sánchez-ucrós, & Loaiza-echeverri, 2008).

Dentro de los signos clínicos reportados se encuentra la anorexia, fiebre leve o moderada, descarga nasal, pérdida de peso, membranas mucosas pálidas, dolor muscular o articular, linfadenopatía, vómito, diarrea, epistaxis y hematuria (Das & Konar, 2013).

Las lesiones oculares son signos comunes en las infecciones tanto naturales como experimentales con *E. canis*, con una prevalencia que puede variar entre el 15% o incluso hasta el 100% de los casos (Frank & Breitschwerdt, 1999; Komnenou et al., 2007; Leiva, Naranjo, & Peña, 2005; Oriá et al., 2008; Oriá, Pereira, & Laus, 2004). Dentro de los signos oculares más comúnmente reportados está la uveítis anterior, panuveítis (Das & Konar, 2013; Massa, Gilger, Miller, & Davidson, 2002; A. Oriá et al., 2008; A. P. Oriá et al., 2004; Veloso et al., 2018; Walser-Reinhardt, Schaarschmidt-Kiener, Forster, Matheis, & Spiess, 2012); glaucoma secundario, hemorragias de la retina o vítreo, coriorretinitis, atrofia de la retina, neuritis óptica, hifema, edema corneal, hemorragias conjuntivales, desprendimiento de retina y escleritis necrotizante (Komnenou et al., 2007; Leiva et al., 2005; Panciera, Ewing, & Confer, 2001) condiciones que pueden llevar a la pérdida parcial o total de la visión de los pacientes infectados (Gould, Murphy, Rudorf, & Crispin, 2000).

Las lesiones oculares de tipo hemorrágico pueden presentarse en un 29,4% los pacientes infectados con *E. canis* (Leiva et al., 2005), lo que puede deberse a alteraciones hematológicas propias de la infección; una asociación entre anemias y trombocitopenias con la presencia de lesiones de tipo hemorrágico en los ojos fue encontrada en caninos con diferentes patologías (Shelah-Goraly, Aroch, Kass, Bruchim, & Ofri, 2009), sin embargo, los reportes de hallazgos oculares en pacientes

infectados con *E. canis* han sido descritos como manifestaciones propias de la enfermedad debidas al depósito de inmunocomplejos en los vasos sanguíneos locales (Harrus, Day, Waner, & Bark, 2001; Harrus, Ofri, Aizenberg, & Waner, 1998; Komnenou et al., 2007; Veloso et al., 2018) y no se han evaluado como complicaciones relacionadas a las anormalidades hematológicas que se presentan con esta patología.

Debido a la variedad de signos clínicos oculares y de laboratorio que presentan los pacientes infectados con *E. canis* y si se tiene en cuenta el riesgo que tienen los caninos colombianos en zonas tropicales a adquirir infecciones rickettsiales, se hace necesario identificar si existe asociación entre dichas lesiones oculares y los trastornos hematológicos a los que conlleva la ehrlichiosis, para que de esta manera se pueda estudiar las implicaciones pronósticas que pueden tener estos hallazgos laboratoriales en la salud ocular de los caninos infectados.

## 1.2 Objetivos general y específicos

Objetivo general.

Asociar las lesiones oculares y los hallazgos hematológicos en pacientes caninos infectados con *Ehrlichia canis*.

Objetivos específicos.

- Identificar pacientes positivos a *Ehrlichia canis*.
- Realizar cuadros hemáticos de los caninos infectados e identificar las alteraciones oculares presentes en cada uno de estos pacientes.

- Relacionar los hallazgos clínicos y los hallazgos laboratoriales encontrados.

### 1.3 Hipótesis general del proyecto

¿Existe relación entre las alteraciones oculares y los trastornos hematológicos en pacientes positivos a infección con *Ehrlichia canis*? ¿Podrían estos hallazgos hematológicos tener implicaciones pronósticas en la salud ocular de los caninos infectados?

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. *Ehrlichia* spp

La *Ehrlichia* es una bacteria gramnegativa, pleomórfica, intracelular obligada que infecta a una amplia gama de mamíferos. El género inicialmente incluyó 10 especies clasificadas en base a la célula huésped infectada: especies que parasitan monocitos (*E. canis*, *E. risticii*, *E. sennetsu*), granulocitos (*E. ewingii*, *E. equi*, *E. phagocytophila*) y trombocitos (*E. platys*). La última clasificación fue realizada en base a las similitudes de la secuencia genética del ARN ribosomal 16S entre los genogrupos de *Rickettsia* (*Ehrlichia*, *Cowdria*, *Anaplasma* y *Wolbachia* spp.). En el primer grupo el cual fue nombrado como *Ehrlichia*, están integradas especies como *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, y *E. ruminantium*; el segundo grupo corresponde al género *Anaplasma*, el cual está integrado por: *A. equi*, *A. phagocytophilum* y *A. platys* y el grupo tres fue denominado como género *Neorickettsia* y se conforma por *N. sennetsu*, *E. risticii* y *Neorickettsia helminthoeca* (Dumler et al., 2001; Woldehiwet, 2010).

La ehrlichiosis monocítica canina (CME) es causada por *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii*, pero *E. canis* es el agente que ha sido más estudiado (Little, 2010). El organismo fue descrito por primera vez en caninos por Donatien y Letosquard en 1935 en Argelia (Donatien & Letosquard, 1935, 1937) después de una epizootia importante durante la guerra de Vietnam, la ehrlichiosis se



caracterizó por ser una enfermedad del canino, debido a la infección de muchos perros de raza Pastor Alemán que trabajaban con los militares en dicha guerra (Huxsoll, 1976).

Estas bacterias se transmiten a través de vectores como las garrapatas de la familia *Ixodidae*, particularmente al género *Rhipicephalus* y sus especies *R. sanguineus* y *R. (B.) microplus* (Paternina et al., 2009; Xing-Li, Tian-yin, Hu, & Fen, 2015). Los estados inmaduros de la garrapata se infectan cuando se alimentan de un perro enfermo y pueden mantener dicha infección a través de todos sus estadios, lo que permite la transmisión cuando la garrapata se alimenta de nuevo como ninfa o adulto (Groves et al., 1975). La transmisión de la bacteria se produce posterior a las tres horas de iniciado el periodo de alimentación de la garrapata (Fourie et al., 2013).

Existen gran variedad de cepas de *E. canis* distribuidas por todo el mundo; cepa YZ-1 (Zhang & Wang, 2018), Jake, Florida y Oklahoma en EE.UU, cepa Turquía, cepa VHE, y VTE en Venezuela, cepa 611 y Ranana en Israel, cepa Okinawa y Kagoshima en Japón, cepas Greece1 y 0 en Grecia, cepa Madrid en España (Aguirre, Sainz, Dunner, & Rodri, 2004), cepa PDE en Perú (Vinasco et al., 2007), cepa Gdt3 en Chile y España (López, Abarca, Mundaca, & Caballero, 2012), cepa Nigeria, cepa Camerún, cepa Sur África (Aguiar, 2014) y cepa Sao Paulo en Brasil (Aguiar, Hagiwara, Labruna, & Mato, 2008). Cada una de estas cepas posee una patogenicidad distinta que da lugar a un amplio espectro de signos, que varían desde inaparentes a graves, lo cual depende de las reacciones inmunológicas individuales de cada paciente (Faria et al., 2011; Siarkou, Mylonakis, Bourtzi-hatzopoulou, & Koutinas, 2007; X. Zhang et al.,

2008), como por ejemplo el caso de la raza Pastor Alemán de la que se conoce tiene una mayor morbilidad y mortalidad en comparación con otras razas (Niyindo et al., 1980).

## 2.2. Interacción huésped – patógeno

*Ehrlichia spp* ha desarrollado estrategias moleculares complejas para la adaptación a varios tipos de huésped, tanto vertebrados como invertebrados y para la supervivencia en células efectoras de inmunidad innata (McBride & Walker, 2011). *Ehrlichia spp.* se limita a las vacuolas citoplasmáticas ligadas a la membrana dentro de monocitos/macrófagos y células dendríticas. Una vez allí se replican para la formación de microcolonias llamadas mórulas las cuales corresponden desde 1 o más de 400 organismos.

La *Ehrlichia* individualmente es un organismo cocoide o cocobacilo, pueden exhibir dos tipos de células diferenciadas por su ultraestructura: una célula grande reticulada y una de núcleo denso más pequeña (cuerpo elemental), las cuales representan formas de replicación e infección del microorganismo; por ejemplo los cuerpos elementales se unen a la superficie de la célula huésped y se internalizan en menos de una hora completando su ciclo de desarrollo en 72 horas (Koh, Koo, Biswas, & Kobayashi, 2010; Zhang, et al., 2007).

La secuenciación genética de *E. canis*, *E. ruminantium* y *E. chaffeensis* muestran un alto grado de sintenia genómica ya que todas las especies muestran un genoma con bajo contenido (30%) de Guanina + Citocina (G+C), porciones codificadoras pequeñas y largas regiones genómicas no codificadoras compuestas de numerosas

secuencias repetidas en tándem, dichas repeticiones corresponden a un mecanismo de adaptación al huésped, ya que estas no parecen tener ninguna relación filogenética, lo que sugiere que la duplicación ocurre después de diversificarse el ADN en el momento de la replicación. (Collins et al., 2006; Frutos et al., 2006; Mavromatis et al., 2006). El genoma de *Ehrlichia* posee varias características asociadas a la interacción huésped–patógeno, en primer lugar, genes que codifican para proteínas que contienen repeticiones en tándem y repeticiones anquirina, las cuales se asocian con la regulación y expresión génica; en segundo lugar, una familia de multigenes que codifican para proteínas de polimerización de actina y proteínas de membrana externa; un grupo de tractos poli (G+C) que contienen proteínas; finalmente su genoma no posee genes para la biosíntesis de peptidoglicanos y lipopolisacáridos ya que estos compuestos están ausentes en las paredes celulares de todas las especies de *Ehrlichia* (Mavromatis et al., 2006)

El genoma de las *Ehrlichias* también posee genes que codifican para una familia de sensores de señalización, transducción y sistemas reguladores de respuesta, compuestos de un sensor de histidina quinasa y un regulador de respuesta, que permiten a las bacterias detectar señales y responder a cambios en su entorno a través de la activación o represión genética específica (McBride & Walker, 2011).

### 2.3. Proteínas inmunorreactivas de *Ehrlichia spp.*

2.3.1 Proteínas con repeticiones en tándem (TRP). Las proteínas que cuentan con este tipo de repeticiones genómicas hacen parte de un grupo de moléculas muy inmunorreactivas, lo que quiere decir que están expuestas en la superficie o son

secretadas por la bacteria, por lo tanto, se han asociado con interacciones como adhesión e internalización entre el huésped y el patógeno; en la *E. canis* las glicoproteínas (gp) que se han identificado son la gp19, gp36, gp140 y gp200 (Zhang et al., 2008). La gp 36, es una proteína de membrana que ayuda a mediar la internalización de la bacteria en la célula huésped, además de esto dicha proteína tiene variaciones que sirven para diferenciar genéticamente una cepa de otra lo que la ha sido objetivo de muchos estudios (Aguiar, 2014; Nambooppha, Rittipornlertrak, & Tattiyapong, 2018; Zweygarth et al., 2014). Otra proteína importante en el análisis filogenético de la *Ehrlichia* es la gp 200, la cual ha sido utilizada recientemente para la evaluación de las relaciones genéticas entre cepas (Maekawa et al., 2017).

2.3.2. Proteínas con repeticiones de anquirina. La repetición anquirina (Ank) es un dominio de los eucariotas que media las interacciones entre proteína y proteína para el reconocimiento molecular. *Ehrlichia spp.* se encuentra entre los pocos procariontes que tienen proteínas con repeticiones Ank. La proteína Ank más estudiada en el género *Ehrlichia spp.* es la Ank200, la cual es una proteína inmunorreactiva principal y a su vez es una proteína efectora secretada por el sistema de secreción tipo I de la bacteria, esta se transloca al núcleo de la célula huésped interactuando con la cromatina evitando la expresión diferencial de los genes del hospedador (Lina et al., 2016; Wakeel, Dulk-ras, Hooykaas, & McBride, 2011).

#### 2.4. Sistemas de secreción

La secreción de proteínas efectoras en la célula del huésped requiere de sistemas de secreción por parte de la *Ehrlichia*. En esta bacteria se han identificado muchos de los

componentes conocidos del sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado por genes *virBD*; este sistema se encarga de movilizar macromoléculas a través de la membrana de la célula hospedadora de una manera dependiente de ATP; se conoce como un mecanismo de entrega del factor de virulencia que permite a los patógenos modular funciones de las células eucariotas para su propio beneficio. Para las bacterias intracelulares como la *Ehrlichia* es esencial para la supervivencia al interior de la célula (Gillespie et al., 2010, 2016; Liu, Bao, Lin, Niu, & Rikihisa, 2013; Rikihisa, Lin, Niu, & Cheng, 2009).

De igual manera *Ehrlichia spp.* posee un sistema de secreción tipo I (T1SS), el cual es muy común entre las bacterias gram negativas y dirige la translocación de una gran variedad de proteínas desde el citoplasma hacia el medio extracelular, tales como hemolisinas formadoras de poros, adenilato ciclasas, lipasas, proteasas y hemóforos. El sistema está formado por tres proteínas, una proteína de membrana interna con dominio ATPasa citoplásmico (*E. coli* HlyB), una proteína de fusión de membrana que funciona como adaptador periplásmico (PFM *E.coli* HlyD) y una proteína de canal de la membrana externa de la familia TolC de las *E.coli*. La interacción del sustrato del T1SS con HlyB y HlyD, desencadena el reclutamiento de las TolC, creando así un túnel continuo, pero transitorio, desde el citosol de la bacteria directamente hacia medio extracelular (Wakeel et al., 2011).

## 2.5. Inmunopatogenia

La patogenia de la CME implica dos tipos de efectos, unos directos causados por la bacteria sobre el organismo y unos indirectos que son producto de reacciones

inmunomediadas; la inhibición del tráfico bacteriano a los lisosomas, la formación de fagolisosomas a través fusión lisosomal, la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS). La inhibición de la apoptosis de la célula huésped, la baja regulación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II en monocitos/macrófagos y la recombinación de genes de proteínas de membrana externa (lo que resulta en variación antigénica), son los mecanismos de evasión inmunitaria que han sido documentados para la *Ehrlichia*. La inducción de la anemia hemolítica por *E. canis* y la presencia anticuerpos anti plaquetas y complejos inmunes circulantes sugieren la implicación de mecanismos inmunes en la patogénesis de la enfermedad (Harrus, 2015).

El canino adquiere la enfermedad al ser picado por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* ya que los monocitos son atraídos al sitio de fijación del vector y son infectados por los cuerpos elementales de *Ehrlichia spp.* que están presentes en su saliva (Kelly, 2000). El ingreso a las células del huésped incluye procesos de adhesión, internalización y proliferación intracelular que se continúa por exocitosis y finalmente la difusión a otras células. Una vez el patógeno es liberado en el huésped vertebrado, el cuerpo elemental de *Ehrlichia spp.* expresa TRP120 (gp120) en su superficie y esta glicoproteína desempeña un papel muy importante en el proceso de unión e ingreso a la célula huésped. La invasión de la célula eucariota está regulada por un segundo mensajero bacteriano el diguanilato cíclico (c-di-GMP) y la actividad de la serina proteasa de la superficie de la *Ehrlichia* (Kumagai, Matsuo, Hayakawa, & Rikihisa, 2010; McBride & Walker, 2011).

Los patógenos de la familia *Anaplasmataceae* utilizan una amplia gama de proteínas incluidas la adhesina y la invasina para ingresar a las células del huésped; la invasina EtpE parece ser la proteína de superficie utilizada para la adhesión, esta proteína de membrana se une al glicosilfosfatidilinositol (GPI) que es un glucolípido terminal de la proteína DNasa X que se encuentra dentro de las caveolas en la superficie de los monocitos, la cual señala el reordenamiento y la formación de filopodios que promueven la absorción bacteriana; una vez internalizada la *Ehrlichia spp.* es contenida en vacuolas que se convierten en endosomas tempranos. Éstas vacuolas conservan características como: el antígeno endosómico temprano 1 (EEA1) y la proteína Rab5A que son reguladores del tráfico vesicular; los receptores transferrina (TfR) que fueron acumulados durante la inclusión temprana del patógeno y que contribuyen a adquirir hierro de las células del huésped (Bottari et al., 2016). Finalmente conservan la H<sup>+</sup> ATPasa de tipo vacuolar (Moumene & Meyer, 2016). La vacuola ehrlichial exhibe la proteína Rab7 la cual controla la agregación y la fusión con los lisosomas, además de esto acidifica el pH a 5.2 dentro de los macrófagos para facilitar la supervivencia del microorganismo y la replicación intracelular, para ello también cuenta con la capacidad de modificar la membrana vacuolar con el fin de tener un desarrollo eficiente dentro de ella (Cheng et al., 2014).

Para poder sobrevivir dentro de la célula hospedadora y aprovecharse de sus recursos, *Ehrlichia spp.* debe asegurarse de que esta no inicie un proceso de apoptosis, así lo hace por ejemplo la *E. ewingii* la cual estabiliza la membrana mitocondrial, retrasando la pérdida del potencial de dicha membrana y de esta manera evita la apoptosis espontánea en los neutrófilos que parasita; además de esto *E.*

*ewingii* disminuye la actividad de la caspasa 3 que es la principal enzima implicada en la muerte celular programada (Xiong, Bao, Ge, & Rikihisa, 2008). En general para las Ehrlichias, las TRP provenientes del T4SS son las encargadas de inhibir la apoptosis, algunas de ellas se translocan al núcleo para modular activamente la transcripción y expresión génica de la célula hospedadora, a través de múltiples mecanismos que incluyen interacciones directas con la cromatina y la modulación de la señalización a tal punto que los niveles de transcripción de un porcentaje relativamente pequeño (5%) de los genes de la célula huésped se alteran significativamente dentro de las primeras 24 horas postinfección. Los procesos celulares específicos que parecen ser modulados son los inhibidores de la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la diferenciación, la transducción de señales, la expresión de citoquinas proinflamatorias, proteínas biosintéticas y metabólicas y proteínas de tráfico de membrana (McBride & Walker, 2011). No todas las proteínas actúan directamente sobre el núcleo, otras TRP actúan como efectores (ECH0825) que ingresan a la mitocondria para regular de manera positiva la proteína de matriz mitocondrial superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y disminuyen las especies ROS previniendo el daño causado por estas y evitando la apoptosis, para de esta manera asegurar la infección intracelular (Liu et al., 2013).

Adicional a lo anterior, *Ehrlichia spp.* puede alterar la vía de señalización JAK / STAT que tiene un papel esencial en la señalización de citoquinas, por lo tanto, puede inhibir la activación de los macrófagos por los interferones y las interleucinas (IL). En el caso de la infección por *E. chaffeensis*, esta bacteria evade las respuestas inmunes al inhibir directamente la transcripción de citocinas contra bacterias intracelulares tales



como IL12, IL15 e IL18; estas citoquinas desempeñan un papel fundamental en la estimulación de los linfocitos T ayudadores (TH1) y las células asesinas (NK) para producir interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), que terminará por activar a los macrófagos; por lo tanto, dicha supresión de la producción de citoquinas evita la muerte de *Ehrlichia* dentro de estas células (Moumene & Meyer, 2016).

Los monocitos y macrófagos expresan en su membrana receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll (TLRs) y en su citoplasma se encuentra el receptor dominio de oligomerización unido a nucleótido (NOD). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) como los lipopolisacáridos (LPS) y el peptidoglicano. Tales uniones provocan una respuesta por parte de la inmunidad innata de la célula, con la consecuente eliminación del patógeno (Unver, Huang, & Rikihisa, 2006). Las bacterias del género *Ehrlichia* no poseen genes que codifican para LPS y peptidoglicanos de la pared celular, por lo tanto, estas bacterias deben incorporar el colesterol derivado de las membranas de las células huésped para garantizar la integridad de su membrana. Esto genera una gran ventaja, ya que al no poseer LPS y peptidoglicanos se inhibe la unión de estos ligandos a los receptores, lo que tiene como consecuencia que los leucocitos no se activen para eliminar al microorganismo (Gutierrez, Perez, & Agrela, 2016). En infecciones crónicas con *E. chaffeensis* se demostró que esta bacteria regula negativamente los TLR ya que disminuye la expresión de estos receptores para otras bacterias (Lin & Rikihisa, 2004).

En las primeras etapas de la infección *Ehrlichia spp.* se moviliza entre las células gracias a los filopodios de los macrófagos, estos son prolongaciones citoplasmáticas

que le permiten a la bacteria salir de una célula infectada e ingresar a una célula sana vecina sin entrar en el espacio extracelular, facilitándole la evasión del sistema inmune del huésped (Moumene & Meyer, 2016); en este proceso se ven involucradas la TRP47 y TRP120 de la *Ehrlichia*, ya que ellas interactúan con proteínas del citoesqueleto del macrófago y con proteínas accesorias como ARP2 y CAP1, facilitando la formación de dichos filopodios (Dunphy, Luo, & McBride, 2014). Este proceso se ve impedido por la enzima citocalasina D, la cual es un inhibidor de los filamentos de actina que interrumpe el transporte ehrlichial, debido a esto, en las etapas tardías de la enfermedad la bacteria solo es liberada por la ruptura de la membrana de la célula huésped adyacente a la mórula (Alves, Levenhagen, et al., 2014a; Levenhagen, Alves, Rieck, Labruna, & Beletti, 2012; Thomas, Popov, & Walker, 2010).

La respuesta proinflamatoria inducida por *Ehrlichia spp.* llega a ser tan fuerte que se puede desarrollar un cuadro fatal de ehrlichiosis, ya que se activa la expresión de componentes del inflammasoma que conducen a la activación de caspasas 1 y 11, además se promueve a la secreción de IL18, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , interferón tipo I (IFN-I), células Th1 y NK .(Yang, Stevenson, Scott, & Ismail, 2015).

El periodo de incubación de la enfermedad varía de los 8 a los 20 días y posterior a él, se han documentado tres fases de progresión, la aguda con una duración aproximada de 2 a 4 semanas, la subclínica que puede durar varios meses o años y la crónica; la diferenciación de las fases no es posible realizarla en casos de infección natural; los perros inmunocompetentes pueden eliminar la infección durante las fases agudas o subclínicas, pero si por el contrario su sistema inmune no es competente pueden desarrollar la fase crónica la cual se caracteriza por una hipoplasia o aplasia

de la médula ósea que se ve reflejada en una pancitopenia, en esta fase la mortalidad es mayor debido a la septicemia o el sangrado (Mathios Mylonakis & Theodorou, 2017). Las condiciones que pueden precipitar la ocurrencia de la mielosupresión no están completamente claras, este fenómeno ha sido asociado por ejemplo, a la sensibilidad de la raza a la infección como es el caso de los pastores alemanes; de igual manera se ha asociado a coinfecciones con otros patógenos transmitidos por vectores como la *Leishmania infantum*, *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, y *Bartonella spp.*(Day, 2011).

El cuadro clínico de la ehrlichiosis canina puede ser el resultado de trastornos en varios sistemas entre ellos el sistema señalización purinérgico que utiliza nucleótidos y nucleósidos (adenosina) de purina como mensajeros extracelulares y está involucrado en funciones relacionadas con la respuesta inmune y trastornos de la coagulación. Este sistema de señalización se compone de purinas, receptores y enzimas. Ante la presencia de microorganismos dentro de las células y daño de las mismas, los niveles de adenosina y de proteína G aumentan; el aumento de este nucleósido disminuye la producción de interleucinas, inactiva macrófagos, reduce la expresión de moléculas del MHC clase II, de la enzima óxido nítrico sintasa y la producción de citocinas proinflamatorias, logrando de esta manera una menor respuesta inmunitaria por parte del organismo. Por su parte la proteína G, se une a los receptores de adenosina produciendo vasodilatación, inhibición de la inflamación y modulación del sistema nervioso simpático. Para contrarrestar la acción de este nucleósido en el núcleo de las células se libera adenosina desaminasa (ADA) que degrada la adenosina; algunas isoformas de la enzima se quedan en el citosol y otras

viajan a la superficie celular convirtiéndose en una ecto-enzima que se une al receptor CD26 que se encuentra también allí y su función principal es la desaminación de la adenosina cuando esta se encuentra en niveles muy altos que disminuye la respuesta inmunitaria y puede llegar a ser tóxica para los linfocitos, de este proceso se obtiene ácido úrico como producto final el cual actúa como antioxidante (Da Silva et al., 2013; Goncalves & Ibarra, 2010).

El rol de la adenosina en el desarrollo de la ehrlichiosis se debe a su participación en los trastornos inflamatorios y de la coagulación, alteraciones que han sido descritas en esta enfermedad; la adenosina tiene una acción antiinflamatoria y antiplaquetaria lo que le permite actuar como un potente vasodilatador. Altas concentraciones de adenosina que se han evidenciado en el día 12 post infecciones podrían estar relacionadas con un mecanismo compensatorio que actúa sobre receptores purinérgicos que atenúan la inflamación y el daño del tejido, pero que a su vez interfieren en el proceso de la agregación plaquetaria y por lo tanto contribuyen a la intensificación de las hemorragias (A. S. Da Silva et al., 2013).

La trombocitopenia es la anormalidad hematológica más frecuente en perros con ehrlichiosis y esta ha sido atribuida a diferentes mecanismos dependiendo de la fase de la enfermedad; en la fase aguda de la enfermedad se atribuye a un aumento del consumo plaquetario, debido a los procesos inflamatorios en el endotelio vascular, aumento del secuestro a nivel esplénico y destrucción inmunológica que termina por reducir la vida media plaquetaria (Harrus, 2015; Harrus, Waner, Eldor, Zwang, & Bark, 1996; Waner et al., 1995). Además de esto, la presencia continua de *E. canis* en el organismo resulta en la producción excesiva de inmunoglobulinas G (IgG) que pueden

llevar al desarrollo de una hipergammaglobulinemia que es un trastorno frecuente en pacientes con este tipo de infección y que puede conllevar al desarrollo de anticuerpos no específicos (Bhadesiya & Raval, 2015). Anticuerpos antiplaquetarios pueden generarse en la fase aguda de la infección y pueden ser responsables de la disminución de la agregación plaquetaria y la fijación de las mismas (Harrus, Waner, Weiss, Keysary, & Bark, 1996; Waner et al., 1995). De las especies causantes de ehrlichiosis en caninos, es *E. canis* la que más genera respuestas de anticuerpos (IgG), sin embargo esta respuesta no es suficiente para eliminar la bacteria de la circulación (Nair et al., 2016).

Otra razón por la cual se disminuye el recuento plaquetario es que los pacientes infectados por *E. canis* presentan una citocina sérica que se involucra en la patogenia de la trombocitopenia y es el factor inhibitorio de la migración plaquetaria (FIMP), su concentración es inversamente proporcional al recuento de plaquetas. El FIMP es producido por los linfocitos que han sido expuestos a los monocitos previamente infectados por la bacteria e inhibe la migración de los trombocitos. Altas concentraciones de FIMP han sido asociadas a cepas más virulentas de *E. canis* (Gutierrez et al., 2016; Hasegawa, Hagiwara, Kohayagawa, & Branda, 2006).

Los pacientes con ehrlichiosis además de tener trombocitopenia tienen disfunción plaquetaria o trombocitopatía, este trastorno junto a una reducción en el nivel de plaquetas circulantes contribuye con las hemorragias observadas en las infecciones por *E. canis* (Harrus et al., 1996).

En la fase crónica, los animales presentan pancitopenia la cual es producto de la hipoplasia o aplasia medular que se reporta en caninos con ehrlichiosis (Frank & Breitschwerdt, 1999; Frezoulis et al., 2017; Sainz et al., 2015). Este trastorno parece estar relacionado con la cepa de *Ehrlichia* que adquiere el paciente y de la respuesta inmunológica del mismo, es decir si es por parte de los linfocitos T ayudadores de tipo 1 (Th1) o por las células T de tipo 2 (Th2) ya que el perfil de citocinas dependiendo del tipo de célula T varía; IFN- $\gamma$ , IL-2 y factor de necrosis tumoral (TNF) beta son producidos por las células Th1 y se encargan de la activación de macrófagos; en contraste a ellas IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13 son producto de las Th2 y son responsables de una fuerte respuesta por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones del macrófago. Altos niveles de IFN-  $\gamma$  se han asociado a cuadros leves de enfermedad y contrario a esto la IL1 $\beta$  persistentemente elevada e IL-8 se han encontrado en perros severamente afectados (Mylonakis, Siarkou, & Koutinas, 2010; Tajima & Rikihisa, 2005; Tajima & Wada, 2013; Unver, Huang, & Rikihisa, 2006).

Si bien la inmunidad celular es fundamental para la protección contra *E. canis*, la respuesta humoral exuberante parece que no confiere protección y por el contrario puede ser perjudicial para el anfitrión por el depósito de complejos inmunitarios en muchos tejidos. La posible destrucción de células madre en la médula ósea al parecer tiene una patogénesis inmunomediada ya que en médula ósea de perros severamente infectados se han encontrado, además de células mononucleares con inclusiones parasitarias, mayor cantidad de plasmocitos y mastocitos que en los perros con un cuadro leve de enfermedad (Moreira & Passos, 2005; Mathios E Mylonakis, Koutinas, & Leontides, 2006).

El aumento de las inmunoglobulinas también puede generar vasculitis por reacción de tipo 3 o por inmunocomplejos donde el agente infeccioso o porciones de él actúan como antígenos y una vez alcanzada la zona de equivalencia, los complejos inmunes se precipitan y quedan atrapados dentro de las paredes de los vasos, estimulando una respuesta inmune que conduce a una lesión vascular; sin embargo, la principal causa de vasculitis en la ehrlichiosis es la infección del tejido subendotelial por la migración de células mononucleares infectadas, lo que provoca la atracción de más leucocitos que liberan citocinas que causan daño tisular y mayor activación de macrófagos y linfocitos (Guillevin, Shoenfeld, Belizna, & Hamidou, 2009).

Estas células infectadas invaden el tejido subendotelial en los pulmones, los riñones y las meninges en la fase aguda de la enfermedad y se ha demostrado que la deposición de complejos inmunes en los riñones puede desencadenar glomerulonefritis y predisponer al animal a proteinuria transitoria con pérdida de albúmina; también es posible observar pacientes con aumento de las concentraciones séricas de urea y creatinina lo que sugiere el desarrollo de azotemia pre-renal y / o glomerulopatía en casos crónicos (Silva et al., 2016). El daño renal es evidente en dichos casos y este se ha asociado con amiloidosis (Luckschander, Kleiter, & Willmann, 2003).

Otros órganos afectados en la ehrlichiosis canina, son el pulmón, el hígado y el bazo, los cuales se ven afectados por la infiltración de células mononucleares perivasculares; el grado de inflamación y de infiltración de dichos órganos varía dependiendo de la especie de *Ehrlichia*, siendo *E. canis* la que genera mayor grado de afectación (Mylonakis et al., 2010; Nair et al., 2016).

### 2.5.1 Patogenia de las lesiones oculares.

La patogenia de los signos oculares se ha cuestionado por varios autores a través del tiempo; se ha considerado que por tratarse de trombocitopenia la alteración de laboratorio más frecuente en caninos infectados con *E. canis*, esta pudiera ser la causante de las lesiones de tipo hemorrágico en los ojos (Woldehiwet & Ristic, 1993; Woody & Hoskins, 1991); por otra parte las lesiones hemorrágicas oculares, también han sido asociadas a disfunción plaquetaria (Harrus et al., 1996; Lovering, Pierce, & Adams, 1980). También han sido detectados anticuerpos anti plaquetas identificados en suero (APA) después de la infección experimental con *E. canis*, basados en esto, se propuso que los APA se unen a la glicoproteína plaquetaria y de esta manera conducen a la disfunción de estas células (Harrus, Waner, et al., 1996; Waner et al., 1995)

Harrus y colaboradores en 1998 propusieron una causa adicional a la trombocitopenia para las lesiones hemorrágicas en los ojos de perros infectados con *E. canis* y esta fue la gammapatía monoclonal la cual está asociada con trastornos hemorrágicos y síndrome de hiperviscosidad; la hemorragia que induce la gammapatía es consecuencia del recubrimiento de las plaquetas por las altas concentraciones de anticuerpos circulantes, lo que conlleva a una disfunción plaquetaria, a prevención de la liberación del factor III plaquetario y a la unión de las proteínas en la cascada de la coagulación. El síndrome de hiperviscosidad en paraproteinemias es el resultado de las concentraciones elevadas de paraproteínas séricas en los vasos sanguíneos lo que puede causar aumento de la presión oncótica resultando en hipervolemia. La elevación de la presión oncótica, así como los cambios isquémicos secundarios a la



hiperviscosidad, pueden ser causa de retinopatía hipertensiva e hifema (Harrus, Warier, et al., 1996; Hoskins, Barta & Rothschmitt, 1983)

Otros mecanismos propuestos incluyen la deposición de complejos inmunes en las paredes de los vasos sanguíneos del tracto uveal lo que promueve un aumento de la permeabilidad vascular, así como un desequilibrio de las barreras oculares que permite la afluencia de células inflamatorias mononucleares al ojo, acentuando las lesiones en el tracto uveal; la inflamación también se incrementa por la activación de la cascada de ácido araquidónico asociada con la lesión de las membranas celulares, lo que resulta en un aumento en las concentraciones de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Harrus et al., 2001; Veloso et al., 2018). Estos metabolitos del ácido araquidónico pueden conllevar a las alteraciones oculares clásicas de la uveítis como la llamada acuosa, fotofobia, hiperemia, miosis y disminución de la presión intraocular (PIO) ya que el ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos de la membrana celular, a través de la acción de la fosfolipasa A2 después de la lesión tisular, la ciclooxigenasa convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina, mientras que la lipoxigenasa lo convierte en leucotrienos e hidroperoxi e hidroxieicosatetraenoico; en respuesta a la liberación de estos metabolitos, las células inflamatorias se infiltran en el tracto uveal, al mismo tiempo que el factor activador de plaquetas liberado de células dañadas, leucocitos y células cebadas promueve la agregación plaquetaria. La histamina, las prostaglandinas y las cininas aumentan aún más la permeabilidad vascular, siendo las prostaglandinas además potentes mediadores de la inflamación intraocular que pueden causar miosis

por acción directa sobre el esfínter del iris, hiperemia, y alteraciones en la PIO (Wasik & Adkins, 2010).

## 2.6. Alteraciones hematológicas

Un cuadro hemático, es un componente esencial en el proceso de diagnóstico de ehrlichiosis, durante la fase aguda, la trombocitopenia de moderada a grave es un hallazgo hematológico distintivo, esta se presenta en aproximadamente el 84% de los casos (Bulla et al., 2004; Mylonakis & Theodorou, 2017), pero el número de plaquetas debe ser confirmado con ayuda del frotis para descartar procesos de coagulación de la muestra que alteren el recuento plaquetario (Harrus & Waner, 2011; Shelah-Goraly et al., 2009). En perros infectados experimentalmente el recuento de trombocitos puede llegar a valores que oscilan entre los 20 y 52 x 10<sup>9</sup>/L en aproximadamente tres semanas post infección; dicha alteración en el número de plaquetas normalmente está acompañada de una leve anemia y leucopenia (Harrus & Waner, 2011; Pierangeli et al., 2017), pero en infecciones naturales, la trombocitopenia se puede acompañar de leucocitosis neutrofílica con linfopenia y eosinopenia (Bhadesiya & Raval, 2015; Özata & Ural, 2014; Ruiz & Lopez, 2016; Salazar, Buriticá, Echeverry, & Barbosa, 2014).

En la fase subclínica de la enfermedad a pesar de que los animales no presentan signos clínicos pueden tener cambios hematológicos considerables, así fue demostrado cuando se caracterizó el perfil hematológico de perros en fase subclínica de una infección experimental; el hallazgo hematológico predominante fue la trombocitopenia leve con un aumento concomitante en el tamaño de las plaquetas; los

recuentos leucocitarios se redujeron significativamente en un 78% de los caninos y ninguno de los perros era leucopénico ni neutropénico (Waner, Harrus, & Bogin, 1997).

En la fase crónica se presenta pancitopenia, la cual se relaciona con la hipoplasia o aplasia de la medula ósea que se produce por las infiltraciones de células inmunitarias en las fases crónicas de esta enfermedad (Frezoulis et al., 2017; Mylonakis & Theodorou, 2017)

De acuerdo con esto, el conteo de plaquetas se ha establecido como prueba de detección para ehrlichiosis en regiones que son endémicas, pero se debe tener en cuenta que la trombocitopenia debe confirmarse ya que el número de plaquetas puede ser alterado en ocasiones por manejos inadecuados de las muestras; por tal razón es muy importante evaluar el verdadero recuento de plaquetas cuando se trata de caninos sospechosos (Bulla et al., 2004).

Moonarmart y colaboradores en 2014, basados en la hipótesis de que la trombocitopenia podría usarse como método diagnóstico, encontraron que la disminución en el número de plaquetas se asoció significativamente con la ehrlichiosis; por cada disminución en el recuento de plaquetas de  $10,0 \times 10^9/L$  hubo un aumento de 15% en la probabilidad de tener CME

Los niveles de hemoglobina y el recuento eritrocitario total también disminuyen en los pacientes con ehrlichiosis, esto puede ser la consecuencia de la epistaxis, las hemorragias petequiales o la mielosupresión. Con respecto a los índices eritrocitarios, no se han encontrado variaciones significativas en perros con ehrlichiosis en comparación con perros sanos (Bhadesiya & Raval, 2015).

## 2.7. Hallazgos oculares

Las lesiones oculares son signos comunes en las infecciones tanto naturales como experimentales con *E. canis*, por ejemplo en pacientes infectados experimentalmente y en el desarrollo de su fase aguda, pueden encontrarse lesiones oculares en el 50% de los casos según como lo reporta Martin, (1999). Leiva y colaboradores, en un estudio realizado a caninos infectados con *E. canis* naturalmente, reportaron una prevalencia de las lesiones oculares de un 37% de los 46 perros estudiados (Leiva et al., 2005); Komnenou et al. en 2007 por su parte, reportaron presencia de uveítis en el 75% de los casos incluidos en su investigación. Debido a esa alta prevalencia, las lesiones oculares han venido siendo objeto de estudio en esta enfermedad ya que pueden llevar a una pérdida total de la visión (Harrus et al., 1998), tal es el caso reportado por Gould y colaboradores en el 2000, acerca de un canino de raza labrador quien presentó pérdida total de la visión después de 36 meses post infección.

La uveítis es el signo ocular más común en caninos que presentan ehrlichiosis, pero es un hallazgo mayormente asociado con la infección por *E. canis* y no con las otras especies causantes de dicha enfermedad (Veloso et al., 2018). Un estudio acerca de la histopatología ocular de caninos infectados demostró la infiltración de células inflamatorias, principalmente linfocitos y monocitos en gran parte de los tejidos oculares, esta infiltración inflamatoria puede relacionarse con la formación de complejos inmunitarios que genera la *E. canis*, que provocan que el organismo estimule la producción de células de la inflamación y la defensa (Panciera et al., 2001; Walser-Reinhardt et al., 2012).

Aunque el origen de la uveitis puede ser variado, desde uveítis idiopática hasta neoplasias oculares, las causas infecciosas juegan un papel muy importante, ya que

desde hace varios años se conoce que ocupan aproximadamente un 18 % de todas las etiologías causantes de inflamación ocular y es la *Ehrlichia canis* el principal agente causal de este cuadro clínico (Massa et al., 2002).

Los signos clínicos de uveítis corresponden a un cuadro de dolor e inflamación ocular y estos son fotofobia, blefarospasmo, elevación de la membrana nictitante, epifora, llamarada acuosa, miosis, edema corneal, hiperemia conjuntival, congestión escleral de los vasos sanguíneos, precipitados queráticos, iris bombé, hipopión e hifema (Wasik & Adkins, 2010).

La conjuntiva también se puede ver afectada en la ehrlichiosis canina tal como lo demostró Walser-Reinhardt y colaboradores en el 2012, al reportar un caso de uveítis en un canino de raza maltés, al cual se le aisló mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *E. canis* en una muestra proveniente de la conjuntiva del paciente.

La uveítis producida por *E. canis* puede ser exudativa y conllevar a lesiones severas como desprendimiento de la retina hasta en un 64,7% de los casos (Leiva et al., 2005). Otros signos que pueden verse comúnmente asociados a esta infección incluyen, petequias o equimosis en iris y glaucoma secundario (Wasik & Adkins, 2010). La neuritis óptica, hifema y hemorragias retinianas son otros signos de presentación importante en la infección (Komnenou et al., 2007). El análisis del humor acuoso suele ser una herramienta de gran utilidad diagnóstica en caninos con uveítis anterior, sin embargo, esta prueba no determina las causas de la uveítis excepto si se trata de un origen neoplásico; sin embargo aun cuando la *E. canis* está muy asociada a la presentación de uveítis, esta no ha sido detectada en muestras de humor acuoso (Wiggans, Vernau, Lappin, Thomasy, & Maggs, 2013)

Debido a la importancia de mantener la salud ocular general, en caso de enfermedades sistémicas, se han desarrollado procesos de investigación encaminados a establecer relación entre el cuadro clínico, hematológico, título de anticuerpos y alteraciones oculares, como es el caso del estudio realizado por Oriá y colaboradores en 2008, en el cual se estableció una alta correlación entre uveítis y una serología positiva para *Ehrlichia canis*.

De igual manera Shelah-Goraly y colaboradores en 2009 relacionaron las alteraciones hematológicas presentes en perros con signos oculares, sin importar la causa primaria de enfermedad y llegaron a la conclusión de que los cuadros de trombocitopenia son los que más se relacionan con la aparición de lesiones oculares severas; sin embargo Oriá y colaboradores en 2008 refieren que los resultados hematológicos no siempre corresponden con el nivel de participación oftálmica, los autores reportan una alta correlación de la presentación de uveítis y la serología positiva para *Ehrlichia canis*.

## 2.8. Diagnóstico

### 2.8.1. Citología para detección de mórulas

La detección de mórulas de *Ehrlichia canis* en el citoplasma de los monocitos con la ayuda de un microscopio puede apoyar el diagnóstico de la ehrlichiosis, estas se encuentran dentro de vacuolas ligadas a la membrana. Las mórulas pueden ser identificadas en extendidos de sangre entera, en frotis de capa blanca, en aspirados de bazo, médula ósea y nódulos linfáticos (Faria et al., 2010; Mylonakis, Koutinas, Billinis, & Leontides, 2003) . Desafortunadamente la técnica tiene muchas limitaciones

según lo reportado por los diferentes autores quienes documentan tasas de detección en extendidos de sangre entera muy bajos, entre el 2,5% y 12,4% (Brandão et al., 2015; Elias, 1991; Harrus et al., 2001; Parmar, Pednekar, Jayraw, & Gatne, 2013). La técnica se hace un poco más efectiva cuando se trata de aspirados de órganos linfoides como el bazo ya que la tasa de detección es más alta, aproximadamente un 48% (Faria et al., 2010). La citología de medula ósea parece ser la técnica citológica más sensible junto con el extendido de capa blanca con reportes desde hasta 41,3% y 52% de detección respectivamente (Makino et al., 2015); estudios han reportado que no existe diferencia significativa en cuanto a la sensibilidad de estos dos métodos (Mylonakis et al., 2003).

### 2.8.2. Serología

Existen varios métodos serológicos para el diagnóstico de CME, la detección de anticuerpos (IgG) mediante inmunofluorescencia (IFA) se considera la prueba serológica de oro ya que confirma la exposición a *E. canis*; la seroconversión tiene lugar 28 días post infección (Harrus & Waner, 2011) . La IgM no se considera un indicador confiable de exposición a la bacteria debido a la producción descontrolada de anticuerpos que se genera en el desarrollo de la enfermedad (Mcbride et al., 2003).

El diagnóstico mediante serología puede complicarse debido a las reacciones cruzadas que existen entre la *E. canis* y otros patógenos (Salazar et al., 2014). Se ha identificado una potencial reacción cruzada entre *E. canis* y *A. phagocytophilum* que sucede cuando uno de los patógenos se encuentra en títulos muy altos (Allegoa, Lullb, Ssoc, Egartya, & Reitschwerdta, 2006). Títulos de anticuerpos  $\geq 1:40$  son considerados

positivos a exposición por *E. canis* (Salazar et al., 2014). En los casos de infecciones agudas se recomienda realizar pruebas seriadas con 7 o 14 días de diferencia y si se observa un aumento de 4 veces los títulos de anticuerpos se sugiere infección activa (Harrus & Waner, 2011).

La serología para *E. canis* tiene otra dificultad y es que se comprobó que los títulos de anticuerpos se mantienen durante meses o años después del tratamiento y eliminación de la rickettsia del organismo, esto dificulta el diagnóstico de pacientes con recidivas mediante este método (Bartsch & Greene, 1996).

Además de la inmunofluorescencia que solo puede realizarse en laboratorios especializados, el ensayo inmunoabsorbente indirecto sensible a enzimas (ELISA), también se ha realizado para el diagnóstico serológico de *E. canis* y ha mostrado resultados confiables (Harrus, Alleman, & Bark, 2002). Algunas pruebas serológicas comerciales son basadas en ELISA e incluyen al microorganismo completo como fuente antigénica (ImmunoComb®) y otras solo a una parte de él como es el caso de los ensayos inmunocromatográficos (SNAP 4DX® - Anigen® *E.canis/Anaplasma* Ab Test Kit), las proteínas con mayores propiedades antigénicas son la proteína 2, P43, P30, P120, gp 36 y gp 19 (López et al., 2007).

### 2.8.3. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación son las técnicas más sensibles para el diagnóstico y la caracterización de *E. canis*, para su realización se pueden utilizar muestras de sangre entera, de bazo o de médula ósea, se considera la PCR en bazo mucho más sensible que en otros tipos de muestra; la PCR se puede



realizar desde los 4 o 10 días post inoculación y los genes que han sido reportados para el diagnóstico han sido el gen 16S rRNA, p28, p30, dsb y VirB9 (Harrus & Waner, 2011), actualmente el gen 16SrRNA es el más usado en todo el mundo (Campos et al., 2016; Daramola, Takeet, Oyewusi, Oyekunle, & Talabi, 2018; Huber et al., 2017; Maekawa et al., 2017; Movilla, Altet, Serrano, Tabar, & Roura, 2017; Nazari et al., 2013; Roy, Misra, & Willayat, 2013; Vargas-Hernández et al., 2012a).

Otros genes han sido utilizados para el diagnóstico de *Ehrlichia spp* y otras enfermedades transmitidas por vectores, así lo reportó Alho y colaboradores en 2017, quienes no solo usaron el gen 16s rRNA, sino también el gen 18s rRNA y el gen citocromo c oxidasa (subunidad 1). Por su parte Cabezas en 2012 y Zheng en el 2017 mostraron la utilidad del gen gltA (citrato cintasa) en la detección de esta rickettsia, no solo en el canino si no en su huésped invertebrado (Cabezas et al., 2012; Zheng et al., 2017).

El gen dsb que codifica para la proteína disulfuro óxidoreductasa ha sido objeto de muchos estudios y se utiliza frecuentemente no solo para diagnóstico sino para la caracterización de la *Ehrlichia spp* (Campos et al., 2016; Cicuttin, De Salvo, & Gury, 2016; Gottlieb et al., 2016; L. E. Romero et al., 2011).

La proteína p28 actúa como una adhesina en la membrana externa de *Ehrlichia*, esta se ha detectado in vitro y en el huésped vertebrado. El gen que codifica para esta proteína tiene utilidad para diagnóstico y ha sido estudiado como un antígeno útil para la creación de una vacuna contra la ehrlichiosis (Alves, Rieck, Ueira-vieira, Labruna, & Em, 2014b; Higa et al., 2010). De igual manera el gen que codifica para la proteína

p30 ha sido usado en la detección del microorganismo y secuenciado para evaluar su aplicación como proteína recombinante en el serodiagnóstico; este gen resulta ser muy útil debido a que *E. canis* contiene múltiples copias del gen p30, a diferencia del gen 16S rRNA del cual solo tiene una copia, esto aumenta las posibilidades de detección con el p30 (Ohashi, Unver, Zhi, & Rikihisa, 1998; Pinhanelli, Costa, Silva, Aguiar, & Silva, 2015). Genes de estructura como el gen groEL se han utilizado para detección tanto de *Ehrlichia spp* como de *Anaplasma spp* (Almazán et al., 2015)

Las proteínas del T4SS son moléculas que se han utilizado con finalidad diagnóstica, por ejemplo, la VirB9, que es una proteína estructural del complejo de membrana externa de este sistema de secreción ha sido utilizada en los últimos años para detección de *Ehrlichia canis* (Kledmanee et al., 2009; Kongklieng et al., 2014). Otras proteínas de este sistema de secreción son las VirD4, estas corresponden a proteínas de acoplamiento ya que conforman el receptor T4CP del T4SS y se han caracterizado para la identificación de efectores y la comprensión de la patogenia de la ehrlichiosis en los humanos (Felek, Huang, & Rikihisa, 2003; Liu et al., 2013; Ohashi, Zhi, Lin, & Rikihisa, 2002) .

La PCR cuantitativa o en tiempo real (RT PCR) es más sensible que la PCR convencional y permite la cuantificación de la carga bacteriana (copias /  $\mu$ l). Se ha utilizado para la cuantificación de carga ehrlichial en perros infectados de manera natural y experimental (Baneth, Harrus, Ohnona, & Schlesinger, 2009); otra ventaja que ofrece la técnica es un menor riesgo a contaminaciones en comparación con la PCR convencional y en caso de haberla, se puede detectar fácilmente mediante el uso

de análisis de curvas de fusión; estas características hacen de la PCR en tiempo real la técnica preferida para el diagnóstico de esta enfermedad (Harrus & Waner, 2011).

Debido a esta preferencia, existen en el mercado pruebas de PCR rápidas (PCRRun®) que pueden ser realizadas al interior de la clínica veterinaria o de un laboratorio y que facilitan la práctica profesional. Un nuevo método de PCR rápido fue evaluado por Thomson et al. en 2018., corresponde al TaqMan y este fue comparado con la tecnología comercial mencionada anteriormente, llegando a la conclusión de que evidentemente ambos métodos de amplificación eran igualmente adecuados para diagnosticar la ehrlichiosis canina y aunque el PCRRun® amplificó claramente todas las especies de *Ehrlichia* clínicamente relevantes que se sabe que infectan perros y humanos, el método TaqMan fue más específico para *E. canis* y *E. minasensis* .

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Localización

El presente estudio se realizó en la ciudad de Ibagué, capital del departamento del Tolima, ubicada en el centro-occidente del país, sobre la Cordillera Central de los Andes entre el Cañón del Combeima y el Valle del Magdalena, en cercanías del Nevado del Tolima. Se encuentra a una altitud de 1285 msnm y tiene una temperatura promedio de 22°C.

#### 3.2. Población y muestra

Los pacientes incluidos en la presente investigación, fueron caninos que acudieron al servicio de la Clínica Veterinaria de Pequeños animales de la Universidad Cooperativa de Colombia, con un cuadro clínico compatible con Ehrlichiosis canina y que fueron diagnosticados como positivos a la infección. No se tuvo en cuenta la edad, raza y sexo ya que esta enfermedad no tiene un grupo de animales susceptibles. El diagnóstico inicial de los pacientes, se realizó mediante una prueba rápida de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocitophilum*/ *A. platys* (Anigen Rapid® E.canis/Anaplasma Ab) basada en un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa de anticuerpos contra estas rickettsias; esta prueba se hizo con la finalidad de descartar pacientes que hubiesen tenido contacto con otros hemoparásitos como *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocitophilum* debido a que los hallazgos clínicos y de laboratorio pueden verse afectados con la presencia de coinfecciones. Lesiones

oculares asociadas al envejecimiento o el desarrollo de enfermedades metabólicas fueron criterio de exclusión. Los criterios de inclusión y exclusión se detallan en la tabla 1.

Se muestrearon en total 120 perros, pero se incluyeron 70 caninos que resultaron positivos al contacto con *Ehrlichia canis* en la prueba rápida; el diagnóstico de estos fue confirmado mediante RT PCR cuantitativa y mediante esta prueba también se descartó la presencia de *Anaplasma spp.* en estos mismos pacientes.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes

Criterios de Inclusión	Criterios de exclusión
<p>Caninos positivos a Ehrlichia en prueba rápida con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia (hematocrito menor o igual al 20 %)</li> <li>• Trombocitopenia (Recuento plaquetario menor o igual a <math>150 \times 10^9/L</math>)</li> <li>• Sin trastornos hematológicos</li> <li>• Pacientes sin tratamiento farmacológico en los últimos 3 meses.</li> </ul>	<p>Positivos en prueba rápida a <i>Anaplasma spp.</i></p> <p>Presencia de lesiones oculares de tipo degenerativo</p> <p>Presencia de lesiones oculares de origen metabólico</p> <p>Neoplasias oculares</p> <p>Pacientes diagnosticados con Linfoma o con sospecha de la enfermedad.</p> <p>Pacientes que hallan iniciado tratamiento farmacológico para la infección</p> <p>Recidivas de ehrlichiosis</p> <p>Pacientes con diagnóstico de Leishmania o sospecha de la enfermedad.</p>

### 3.3. Métodos y procedimientos

Los pacientes positivos a la prueba rápida, fueron inmediatamente sometidos a toma de tres muestras sanguíneas en tubos de recolección de 4ml con EDTA, por punción venosa cefálica utilizando aguja No. 21 para la respectiva realización de cuadros hemáticos. Estos fueron procesados de manera automatizada por la Clínica Veterinaria Huellas (Nit: 900.458.192-7) mediante un Equipo de Hematología Mindray® BC-2800 Vet. y confirmados manualmente en el laboratorio clínico de la Universidad Cooperativa de Colombia, esto con la finalidad de descartar que la trombocitopenia fuese por aglutinación de plaquetas en la muestra y para confirmar recuento de las mismas, realizando conteo por medio de un microscopio (Leica® DM300) y una cámara de Neubauer. Se excluyeron del estudio, muestras en las cuales se observó aglutinación de las plaquetas en frotis o en las que el conteo plaquetario manual tuvo una diferencia por encima del 15% con el automatizado. En el caso del hematocrito (Hto), este fue confirmado mediante la centrifugación de tubos capilares, en una microcentrífuga (Boeco® H-240). Un frotis de capa blanca también fue realizado en este laboratorio, por medio de la centrifugación de un tubo capilar para microhematocrito y coloreado mediante tinción de Wright (Albor® Químicos). Mediante este extendido se buscó identificar mórulas de *E. canis*, *Anaplasma phagocitophylum* y gamontes de *Hepatozoon canis*.

Adicional a las muestras tomadas en estos pacientes, se les realizó un frotis de sangre venosa periférica, tomada del pabellón auricular el cual fue coloreado con tinción de Wright y observado en el microscopio con el objetivo de inmersión (100x), esto con la finalidad de evidenciar presencia de merozoitos de *Babesia spp* y mórulas de *Ehrlichia spp* o *Anaplasma spp*.

De las muestras recolectadas en tubos de EDTA, una se almacenó en refrigeración hasta su traslado al laboratorio para la prueba de RT PCR para confirmar el diagnóstico. Dicha prueba molecular fue realizada por el Laboratorio de Genética Animal MASCOLAB S.A.S (Nit 901.126.484-1), en la ciudad de Medellín-Antioquia. La amplificación del gen 16S rRNA se utilizó para el diagnóstico del género *Anaplasma* y se amplificó el gen TraG, que codifica para proteínas de tipo VirD4 del sistema de secreción tipo IV del género *Ehrlichia*.

Los pacientes positivos a la RT PCR, se dividieron en grupos de acuerdo con las anomalías encontradas en su hemograma. En el grupo número 1 se agruparon los pacientes con anemia (Hto < 20%) y trombocitopenia (Plaquetas <  $150 \times 10^9/L$ ); el grupo número 2 estuvo compuesto por caninos que presentaban como única anomalía trombocitopenia y en el grupo 3 los perros sin anomalías hematológicas.

Una vez terminada la toma de muestras en los pacientes positivos al contacto con *Ehrlichia canis* en la prueba rápida, estos fueron sometidos a un examen oftalmológico completo de los segmentos anterior y posterior de ambos ojos (ver anexo 1). El examen iniciaba con la evaluación de la producción lacrimal mediante el Test lacrimal de Schirmer (TLS); seguido de esto se evaluaron los anexos y las cámaras oculares con una lámpara de hendidura con biomicroscopio (Zeigen® BL III Portatil). La integridad de la córnea fue valorada a través de las pruebas de fluoresceína y rosa de bengala. Para la evaluación de fondo de ojo se dilató la pupila previamente utilizando Tropicamida en gotas al 1%; una vez dilatada la pupila el examen fue realizado mediante oftalmoscopia indirecta, con un transiluminador ocular Finhoff y un lente de 20 dioptrías para magnificar estructuras, este examen también se realizó a

través de un oftalmoscopio binocular indirecto 125 Welch Allyn® y el mismo lente. En los casos en que la visualización del fondo de ojo no fue posible por alteraciones en la córnea o cámara anterior, se procedió a la realización de ecografía ocular, para verificar la integridad de la cámara posterior y la retina. La PIO fue tomada mediante un tonómetro de aplanación portátil tipo Perkins de marca Kowa® modelo HA-2; para este proceso se instiló de una gota de clorhidrato de proximetacaina al 0.5% como anestésico local; cinco minutos después se hizo aplicación de fluoresceína ya que el tonómetro utiliza este colorante para la medida de la presión.

Las alteraciones oculares observadas se clasificaron como leves, severas o ausentes, definiendo como lesiones leves aquellas que se estimó que tenían poco o ningún impacto en la salud ocular global y la función visual y poca posibilidad de dejar secuelas en el paciente; las lesiones severas fueron aquellas que se consideraron que tenían un marcado impacto en la salud ocular y visual con altas posibilidades de dejar secuelas graves en el paciente.

Las variables que se tuvieron en cuenta en este estudio fueron: hematocrito, recuento plaquetario, recuento leucocitario, número de copias del gen TraG por microlitro de sangre, presión intraocular, test lacrimal de Schirmer y las variables resultantes del examen oftalmológico de cada paciente, las cuales fueron de tipo descriptivo y dicotómicas ya que se registró la presencia o ausencia de las lesiones.

Una vez se tuvo reporte de las lesiones oculares y las alteraciones hematológicas de cada uno de los pacientes, se continuó con el análisis de los datos, para identificar asociación de las lesiones encontradas en el ojo con alteraciones



específicas en el cuadro hemático; de esta manera se identificaron las lesiones más comunes con cada uno de los trastornos hematológicos.

### 3.4. Diseño y análisis estadístico

El presente estudio fue de tipo observacional, prospectivo, de corte transversal, no experimental, con muestreo por conveniencia (no aleatorio). El análisis de las variables fue realizado mediante el programa estadístico STATISTIX 8. La comparación de las variables de tipo cuantitativo como hematocrito (Hto), recuento plaquetario (PLT), recuento leucocitario, número de copias por microlitro del gen TraG (Copias/ $\mu$ l), presión intraocular y test lacrimal de Schirmer entre los diferentes grupos fue realizada mediante ANOVA con un nivel de confianza del 95% y una significancia del 5%. Pruebas de significancia de chi cuadrado se utilizaron para comparar la presencia o ausencia de lesiones oculares entre los tres grupos.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar la severidad de las lesiones (ausente, leve, severa) entre los grupos con la finalidad de establecer si la severidad se relaciona con las alteraciones hematológicas presentes en cada grupo de estudio. Adicional a esto el coeficiente de correlación de Pearson fue realizado para buscar correlación entre los valores del hemograma y el resultado del RT PCR con la PIO y el TLS.

## 4. RESULTADOS

La muestra estuvo comprendida por 120 caninos que acudieron a la Clínica de Pequeños Animales de la Universidad Cooperativa de Colombia con signos clínicos que sugerían infección por *Ehrlichia canis*. El 60,8% de los caninos fueron mestizos. Otras razas también encontradas comprendieron: Pitbull (9,2%), Poodle (5%) y Bull terrier (4,2%); razas como Golden Retriever, Pastor Belga y Schnauzer, contaron con un 2,5% de participación cada una. Pinscher, Cocker Spaniel, Beagle, Pug, Pastor Alemán y Labrador se presentaron con menor frecuencia: 1,7% cada uno. Finalmente las razas que menos se presentaron fueron el Yorkshire terrier, el Bulldog inglés, el Bóxer y el Weimaraner (0,8%).

Dentro de los motivos de consulta predominaron la inapetencia, el decaimiento, aumento de la secreción ocular y ojo rojo. Claudicaciones, fiebre, epistaxis y petéquias también fueron reportados por los propietarios; el 5,8% de los pacientes (7) tuvo como único motivo de consulta alteraciones a nivel ocular (amaurosis, edema corneal, secreción aumentada y buftalmia).

### 4.1. Prueba rápida (Anigen Rapid® *E. canis*/*Anaplasma* Ab)

Los 120 pacientes con signos clínicos compatibles con enfermedades hemoparasitarias fueron sometidos una prueba rápida para *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocitophilum*/ *A. platys*. El 54% (65) de las pruebas indicaron la

presencia de anticuerpos contra *E. canis*; 15,8% (19) de los pacientes presentaron anticuerpos para *E. canis* y *Anaplasma sp* y finalmente solo un 3,3% (4) mostró solo anticuerpos contra *Anaplasma sp*. Los 32 restantes equivalentes al 26,6% resultaron negativos a la prueba.

#### 4.2. Selección de pacientes

Basados en los resultados de la prueba rápida, 70 de los pacientes fueron seleccionados para continuar en el estudio; 65 caninos que resultaron positivos al contacto con *E. canis* y 5 de los pacientes con anticuerpos para *E. canis* y *Anaplasma spp.* (los que mostraron una línea púrpura de alta intensidad para *E. canis*). Estos fueron sometidos a toma de muestras para cuadro hemático, extendidos de sangre periférica, frotis de capa blanca, RT-PCR y posterior a ello se les realizó un examen oftalmológico completo.

4.2.1. Frotis de sangre periférica y capa blanca. Solo en 2 de las 70 muestras de sangre periférica obtenidas se evidenciaron merozoitos de *Babesia spp* dentro de los eritrocitos y en 17 se observaron mórulas de *Ehrlichia spp.* En 13 de los frotis de capa blanca se identificaron mórulas de *Ehrlichia* dentro de los monocitos, 5 de estos también se diagnosticaron por capa blanca. No se encontró presencia de *Anaplasma phagocytophilum* dentro de neutrófilos, ni de *Anaplasma platys* en las plaquetas, tampoco se evidenciaron gamontes de *Hepatozoon canis*.

4.2.2 PCR en tiempo real (RT-PCR). Los resultados de la RT-PCR, basados en la amplificación del gen 16S rRNA para el género *Anaplasma* y el gen TraG que codifica para proteínas de tipo VirD4 del sistema de secreción tipo IV del género *Ehrlichia*, determinaron que de las 70 muestras analizadas 39 resultaron positivas a la

infección con *Ehrlichia sp.* y dos de estos pacientes presentaron coinfección; uno de ellos con *Anaplasma sp* y otro con *Borrelia burgdorferi*. Los resultados de los pacientes positivos a *Ehrlichia sp.* fueron expresados en número de copias del gen TraG, por microlitro de muestra.

#### 4.2.3. Pacientes negativos a *Ehrlichia spp.*

4.2.3.1. *Hemograma.* De las 31 muestras que resultaron negativas al RT-PCR, se evidenciaron tres pacientes con marcada anemia y trombocitopenia, hematocritos menores a 20% y plaquetas por debajo de  $25 \times 10^9/L$ . El hematocrito promedio de estos pacientes fue de 39,8% y una desviación estándar de 10,59%; el recuento plaquetario tuvo una media de  $198.26 \times 10^9/L$ . El recuento promedio de glóbulos blancos de estos pacientes fue de  $14,5 \times 10^9/L$  con un valor mínimo de  $0,6 \times 10^9/L$  y uno máximo de  $32,4 \times 10^9/L$ .

4.2.3.2 *Examen oftalmológico.* En este grupo de pacientes se obtuvo una presión intraocular en promedio de 8,6 mmHg. La producción lacrimal evaluada mediante el Test Lacrimal de Schirmer (TLS) tuvo una media de 17 milímetros (mm). Dentro de las lesiones oculares encontradas en estos pacientes predominó la hiperemia conjuntival en un 41,9% de los caninos, seguido del edema perivascular con un 16,1%; queratopatía de florida y melanosis con un 12,9%; precipitados queráticos y vascularización corneal se encontraron en 9,6% de los pacientes. Lesiones como vasos retinales tortuosos, coriorretinitis y edema corneal se presentaban en 6,45% de los pacientes. Otras alteraciones oculares como quemosis, vasos epiesclerales congestionados, esclerosis, distrofia corneal, catarata, hiporreflexia retiniana, edema de papila y sinéresis de vítreo fueron encontradas con menor frecuencia en este grupo

de caninos cada una de estas en un 3,2% de los pacientes. No se evidenciaron lesiones de tipo hemorrágico en los ojos de estos perros.

#### 4.2.4. Pacientes positivos a *Ehrlichia spp.*

4.2.4.1. *Hemograma.* Al realizar el análisis del cuadro hemático de los caninos diagnosticados como positivos mediante RT-PCR, de los 39 pacientes 10,25% presentaron anemia (hematocritos menores a 20%); trombocitopenia estuvo presente en el 66,6% de los casos (plaquetas menores a  $150 \times 10^9/L$ ); el 28,2% de los caninos tenía leucopenia (Leucocitos por debajo de  $7,0 \times 10^9/L$ ) y leucocitosis un 23,07% de estos (Leucocitos superiores a  $17 \times 10^9/L$ ). Solo un 17,94% de los pacientes no presentó ninguna alteración en el cuadro hemático. Para estos caninos, se obtuvo un hematocrito promedio de  $36,2 \pm 11,1\%$ . El recuento plaquetario de estos pacientes tuvo una media de  $120,13 \times 10^9/L$  y una desviación estándar de  $87 \times 10^9/L$ . El conteo medio de glóbulos blancos fue de  $11,07 \pm 6,7 \times 10^9/L$ , con unos valores relativos promedio en el recuento diferencial que se observan en la Figura 1.

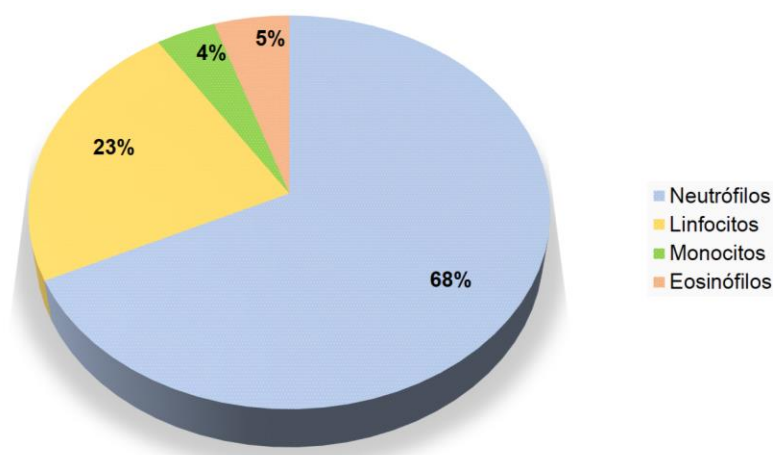


Figura 1. Valores relativos promedio de leucogramas de caninos positivos a *Ehrlichia spp.*

*4.2.4.2. Examen oftalmológico.* De los 39 pacientes, el 89,74% que corresponde a 35 caninos presentaron alteraciones oculares; 17,9% tenían alteración en la producción lacrimal con valores del TLS menores de 10 mm en alguno de los dos ojos. En promedio el TLS para el ojo derecho fue de 16,7 mm en un rango de 3 mm a 28 mm y para el ojo izquierdo de 19,4 mm en un rango de 4 mm a 35 mm; la totalidad de los pacientes presentó un cuadro clínico de uveitis con una PIO promedio de 8,3mmHg y una desviación estándar de 4,1mmHg.

El 58,9% de los perros positivos presentaba hiperemia conjuntival, siendo esta la lesión más frecuente en estos pacientes, seguida del edema perivascular y los precipitados queráticos con un 30,7%. Edema de córnea se encontró en un 25,6% de los perros; hemorragias y desprendimientos de retina se identificaron en 15,38% de estos caninos. Iris bombé también fue encontrado en el 10,25% de este grupo de pacientes, al igual que vascularización corneal, inyección ciliar y vasos episclerales congestionados en un 7,69%. Las lesiones encontradas con menor frecuencia fueron: hifema, vasos retinianos tortuosos y petequias conjuntivales con un 5,12% de presentación cada una y glaucoma, petequias iridales, sinequia de iris y quemosis en un 2,56% de los animales.

La frecuencia de las lesiones oculares encontradas en los pacientes positivos a la infección puede observarse en la Figura 2.

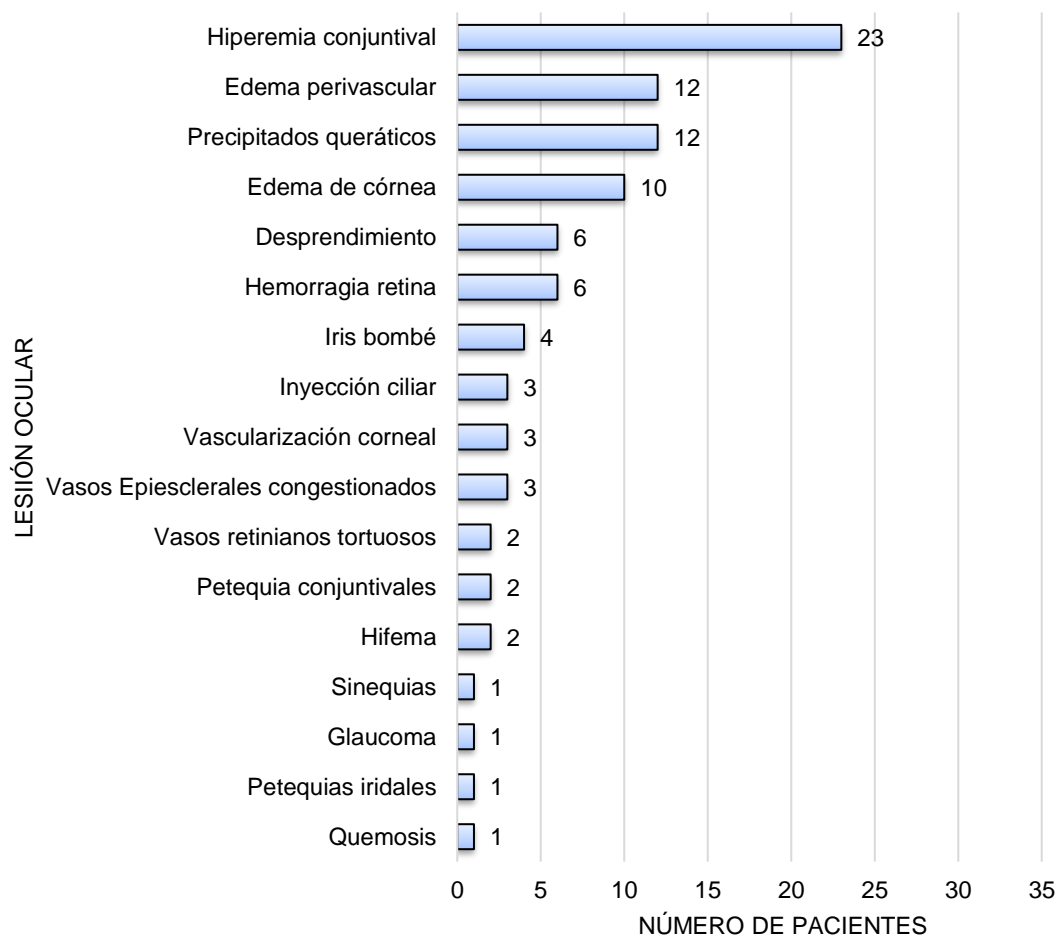


Figura 2. Frecuencia de lesiones oculares en pacientes positivos a *Ehrlichia spp.*

#### 4.3. Relación entre las alteraciones oculares y hematológicas

4.3.1. Grupos de estudio. Con la finalidad de relacionar las alteraciones del hemograma y las lesiones oculares, los caninos positivos diagnosticados mediante RT-PCR, fueron clasificados en tres grupos dependiendo de las anomalías hematológicas que fueron encontradas en ellos: en el primer grupo (G1) los pacientes con anemia y trombocitopenia, en el cual tuvieron cabida 4 animales con un hematocrito menor a 20% y cuyo conteo plaquetario era menor a  $150 \times 10^9/L$ . En el segundo grupo (G2), 22 pacientes con trombocitopenia y finalmente el tercer grupo

(G3) estuvo constituido por 13 pacientes que no presentaron alteraciones sobre el recuento plaquetario y el hematocrito. Los valores promedio del hemograma de estos caninos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Información general de los grupos de estudio y valores hematológicos promedio.

Grupo	N	Edad (años)		Sexo		Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	Hto (%)	Gen TRAG (Copias /μl)
		Me	Rango	Machos	Hembras	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
<b>G1</b> ANEMIA Y TROMBOCITOPENIA	4	1,75	0,6-3	1	3	39,5	3,42	13	1139,8
<b>G2</b> TROMBOCITOPENIA	22	3	0,5-8	11	11	77,13	9,66	35,7	946,18
<b>G3</b> SIN ALTERACIÓN	13	3	1-8	9	4	217,69	15,81	43,92	106,31

#### 4.3.2. Comparación de las variables hematológicas en los grupos de estudio.

Las variables del hemograma fueron comparadas entre los diferentes grupos mediante análisis de la varianza (ANAVA) con un nivel de confianza de 95% y una significancia de 0,05.

4.3.2.1. *Recuento plaquetario.* No se encontró diferencia significativa en el recuento plaquetario entre G1 y G2, pero si existe tal diferencia entre estos dos grupos y G3 (P=0,000). El grupo 1 cuenta con un recuento plaquetario promedio de 39,5x10<sup>9</sup>/L y una desviación estándar (S) de 69,13x10<sup>9</sup>/L, la cual indica gran dispersión de los datos ya que se encontró un valor mínimo de 1,0x10<sup>9</sup>/L y uno máximo de 143x10<sup>9</sup>/L. En el grupo número 2 se tuvo un promedio de plaquetas de 77,13 10<sup>9</sup>/L con una desviación de 35,4x10<sup>9</sup>/L, este grupo tuvo un valor mínimo de 19 x10<sup>9</sup>/L y uno máximo de 146 x10<sup>9</sup>/L. En el grupo 3 en el cual están los pacientes



que no poseen alteraciones en el hemograma el promedio de plaquetas fue  $217,6 \pm 68,82 \times 10^9/L$ ; el mínimo valor encontrado fue de  $158 \times 10^9/L$  y un máximo  $405 \times 10^9/L$ .

*4.3.2.2. Hematocrito.* Existe diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos ( $P=0,000$ ). Los pacientes del G1 presentaron el hematocrito promedio más bajo con un  $13,5 \pm 2,88\%$ , un valor mínimo de 11% y un máximo de 16%; el hematocrito promedio en el G2 fue de  $35,7 \pm 7,7\%$  con un mínimo valor de 24% y un máximo de 51%. En el G3 el valor mínimo fue de 32% y un máximo de 54%, con una media de 43,92% y una desviación estándar de 6,48%.

*4.3.2.3. Recuento leucocitario.* El recuento leucocitario fue analizado en los 3 grupos de estudio y se estableció una diferencia estadística significativa ( $P=0,0001$ ) entre ellos, siendo el grupo 3 el que tuvo recuentos mayores con una media de  $15,81 \times 10^9/L$  y con una desviación de  $4,8 \times 10^9/L$ ; ninguno de los perros pertenecientes a este grupo presentó leucopenia (recuento leucocitario menor a  $7 \times 10^9/L$ ), por el contrario, 38,4% de ellos presentaban leucocitosis (recuento leucocitario mayor a  $17 \times 10^9/L$ ). El grupo 2 tuvo un recuento leucocitario promedio de  $9,66 \pm 6,36 \times 10^9/L$ , en este grupo se obtuvo unos datos más dispersos con respecto a la media; el 36,4% de los pacientes presentaban leucopenia y solo un 9% presentó leucocitosis. Finalmente, los datos del grupo 1 denotaban mayor homogeneidad con respecto a los demás, debido a que la totalidad de los caninos pertenecientes a este grupo presentaron leucopenia, obteniéndose recuentos de glóbulos blancos con una media de  $3,42 \times 10^9/L$  y una desviación estándar de  $3,0 \times 10^9/L$  (ver figura 3).

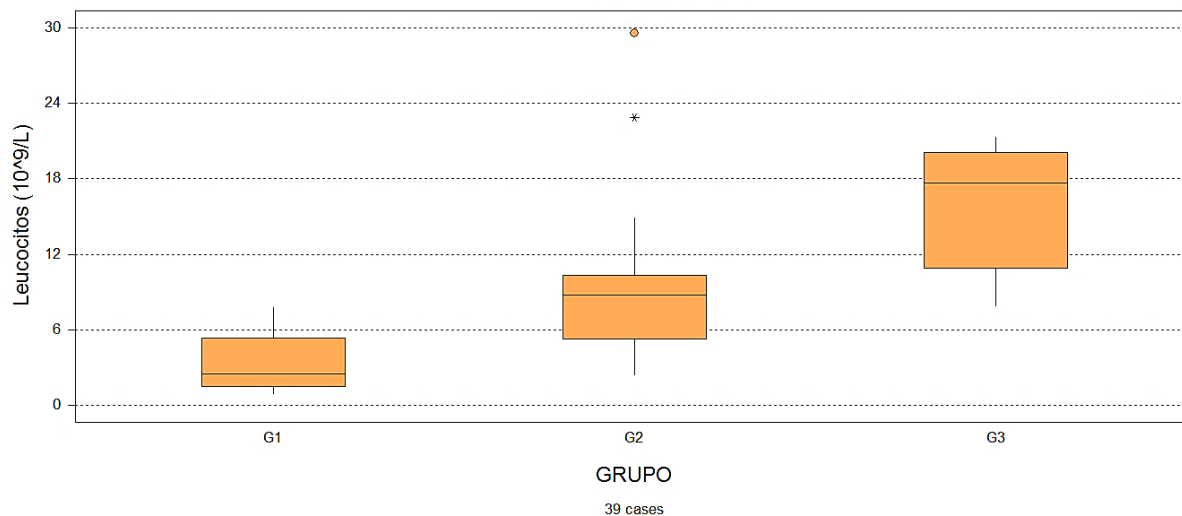


Figura 3. Recuento leucocitario en cada uno de los grupos de estudio.

4.3.2.4. *Número de copias /  $\mu$ l del gen TraG.* Al analizar los resultados de la RT-PCR, se encontró un número de copias /  $\mu$ l del gen TraG menor en el G3 ( $P=0,02$ ), con respecto a los grupos 1 y 2 entre los cuales no hubo diferencia significativa.

4.3.3. Clasificación de las lesiones oculares. Una vez agrupados los pacientes, sus lesiones oculares fueron clasificadas como leves y severas con base en el impacto sobre la salud ocular y visual del paciente y a la posibilidad de generar secuelas en el mismo. La clasificación se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de las lesiones oculares

Lesiones leves	Lesiones severas
Edema corneal	Hifema
Hiperemia conjuntival	Hemorragia retiniana
Petequias conjuntivales	Glaucoma
Petequias iridales	PIO < 5
Precipitados queráticos	Desprendimiento de retina
	Neuritis óptica
	Edema perivascular
	Edema de papila
	Vasos retinianos tortuosos

En el G1, predominaron las lesiones oculares severas en la totalidad de los individuos (4) y en un 75% (3) también se encontraron lesiones leves, siendo la alteración más frecuente entre los pacientes el edema perivascular en un 75% (3) de los animales, seguido de lesiones como petequias conjuntivales, hemorragias retinianas y desprendimiento de retina en el 50% (2) de los caninos; con una frecuencia menor se encontraron sinequias de iris, precipitados queráticos, hiperemia conjuntival, iris bombé, hifema y edema corneal en un 25% (1) de los pacientes.

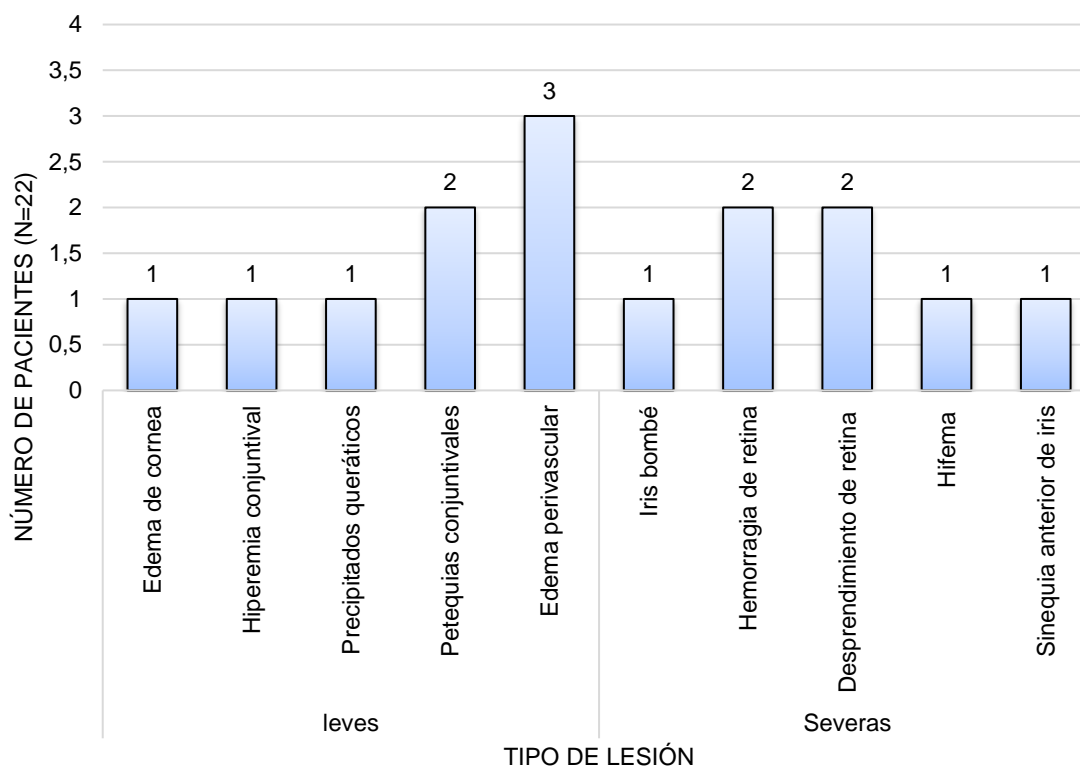


Figura 4. Lesiones oculares en el Grupo 1 (Anemia y Trombocitopenia)

En el G2 el 68,18% (15) de los caninos presentaba lesiones de tipo severa y de este porcentaje de pacientes el 93,3% (14) además presentaba lesiones leves; el 27,7% (6) de los pacientes solo presentó lesiones leves y un 4,5% (1) no tuvo ninguna

lesión ocular. Un 72,72% de los pacientes de este grupo presentó hiperemia conjuntival, siendo esta la lesión más común entre ellos, seguida de los precipitados queráticos y el edema perivascular con 36,36% y 31,81% respectivamente; el edema de córnea fue una lesión encontrada en el 18,18% de los casos; vasos episclerales congestionados (13,63%), vascularización corneal (9,09%) iris bombé, quemosis, vasos retinianos tortuosos, glaucoma (4,54%) y desprendimiento de retina (13,63%) también fueron encontrados en este grupo de caninos; las lesiones hemorrágicas de mayor importancia identificadas en estos pacientes fueron petequias iridales, hifema (4,54%) y hemorragia retiniana (13,63%).

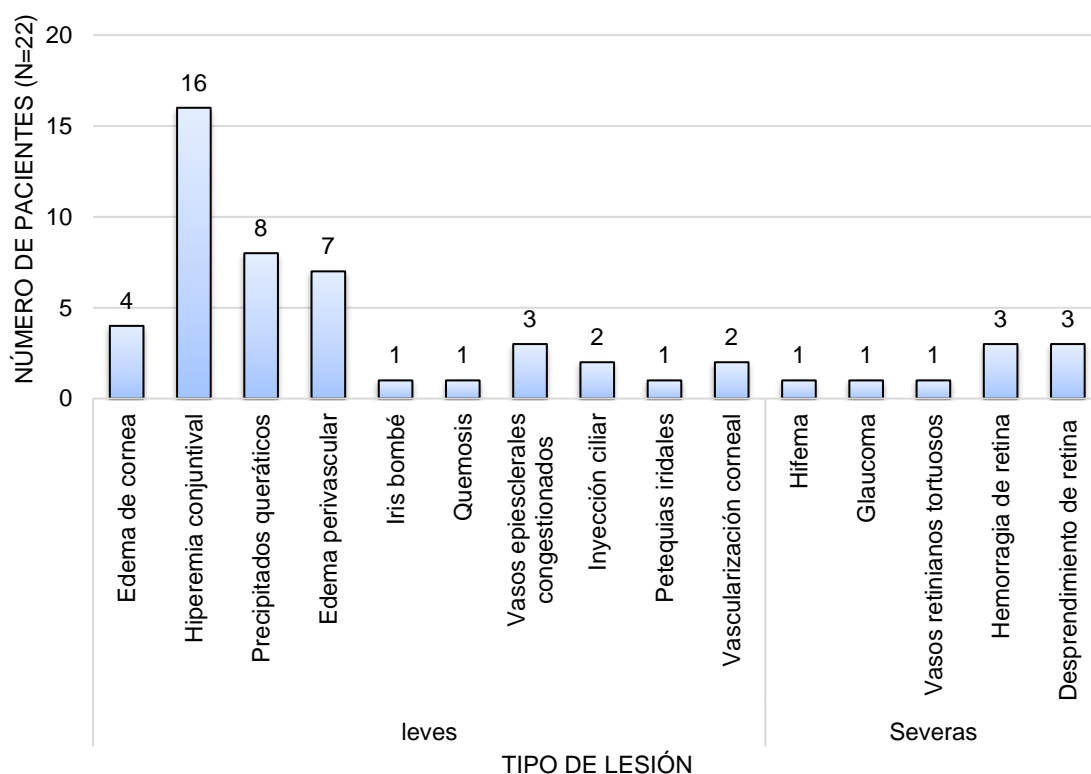


Figura 5. Lesiones oculares en el grupo 2 (Trombocitopenia)

Con respecto al grupo 3 las lesiones más frecuentes fueron las leves en un 53,3% (7) de los perros y en seguida encontramos los pacientes sin lesiones los cuales

correspondían al 23% (3) de este grupo. Un 15,3% (2) de estos caninos presentó lesiones tanto leves como severas y finalmente el 7,7% (1) tuvo solamente lesiones severas. Las lesiones más frecuentes fueron el edema de córnea y la hiperemia conjuntival en un 38,46% y 46,15% respectivamente. El 7,69% correspondiente a uno de los pacientes presentó lesiones severas como hemorragia y desprendimiento de retina. Lesiones como precipitados queráticos (23,07%), edema perivascular, iris bombé (15,38%), y vascularización corneal también fueron encontradas (7,69%).

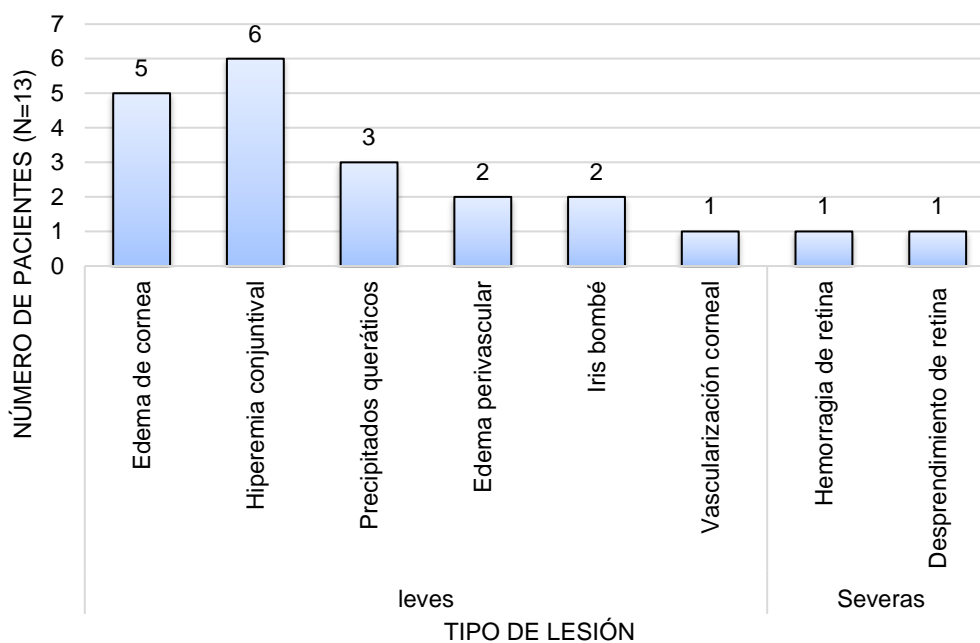


Figura 6. Lesiones oculares en el grupo 3 (sin alteración hematológica)

4.3.4. PIO y TLS en los grupos de estudio. Estas variables fueron comparadas entre los diferentes grupos mediante ANOVA con una confianza del 95%. No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre la PIO entre los 3 grupos ( $P=0,86$  y

P=0,20 respectivamente). El G1 tuvo un promedio de PIO de  $9,37 \pm 4,3$  mmHg, con un valor mínimo de 5,5 mmHg y uno máximo de 15,5 mmHg.

En el grupo 2, la PIO promedio de los pacientes fue de  $8,2 \pm 4,2$  mmHg con valores mínimos de 1,5 mmHg y máximos de 19 mmHg. En cuanto al grupo 3 las PIO tuvieron una media de 8,15mmHg y una desviación estándar de 3,97mmHg. El valor máximo de presión obtenido en estos pacientes fue de 13 mmHg y el mínimo de 1 mmHg.

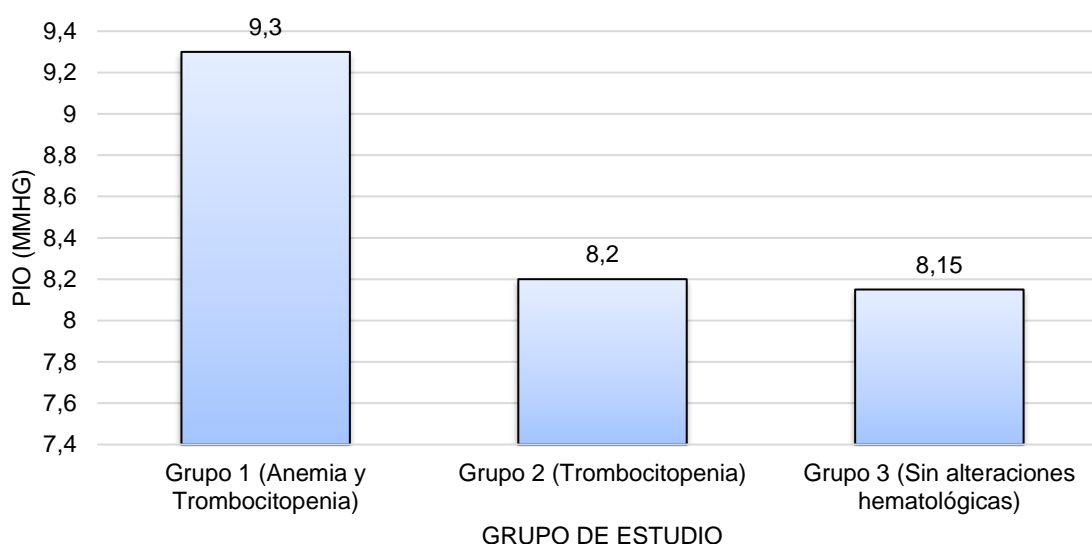


Figura 7. Presión intraocular (PIO) promedio en los tres grupos de estudio

Al respecto del TLS, no se encontró diferencia significativa entre los grupos, el valor promedio para el G1 fue de  $23 \pm 5,8$  mm y ninguno de los pacientes presentó anomalías en cuanto a esta variable; el G2 tuvo una media de 17,2 mm y una desviación estándar de 5,6mm, encontrando valores mínimos de 7mm y máximos de 27mm. Finalmente el G3 tuvo una producción lacrimal promedio de  $17,2 \pm 6,18$  mm, en

este grupo se pudo observar más dispersión de los datos, la cual se reflejó en una mayor desviación estándar con respecto a los dos grupos restantes, se encontraron pacientes con una pobre producción lacrimal expresada en valores del TLS menores a 4mm y unos animales que por el contrario tuvieron lecturas superiores a 25mm.

4.3.5. Lesiones oculares específicas en los grupos de estudio. La presencia o ausencia de alteraciones oculares fueron comparados con la prueba chi-cuadrado con una significancia del 5%, esto con la finalidad de identificar si alguno de los grupos es más propenso a padecer de alguna de las lesiones, es decir si sus anomalías hematológicas tienen influencia en la presencia de algunas lesiones oculares.

Una vez realizada la prueba se encontró que los pacientes del grupo con trombocitopenia (grupo 2), son más propensos al desarrollo de petequias en la conjuntiva en este estudio, en comparación con el grupo 1 con anemia y trombocitopenia y el grupo 3 sin alteraciones hematológicas.

De igual manera se encontró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de P de 0,01 entre la presentación de Sinequia posterior de iris encontrando que el grupo 1 es el más predisponente a esta alteración oftalmológica.

La frecuencia de las demás lesiones que se tuvieron en cuenta en el presente estudio no mostró una diferencia significativa entre los grupos, valores de P mayores al nivel de significancia, lo que indica que la presencia de ellas no depende del grupo es decir del hematocrito y los niveles plaquetarios que fueron criterio para la agrupación de los pacientes.

Tabla 4. Resultados prueba de Chi-cuadrado para las lesiones oculares encontradas en los grupos

LESIÓN	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Prueba X <sup>2</sup>
	No. Pacientes	No. Pacientes	No. Pacientes	VALOR P
Edema de córnea	1	4	5	0,41
Quemosis	0	1	0	0,67
Vasos episclerales ingurgitados	0	3	0	0,28
Hifema	1	1	0	0,13
Hiperemia conjuntival	1	16	6	0,10
Precipitados queráticos	2	8	3	0,68
Petequias conjuntivales	2	0	0	0,0001
Edema perivascular	3	7	2	0,076
Iris bombé	1	1	2	0,35
Hemorragia de retina	2	3	1	0,11
Desprendimiento de retina	2	3	1	0,11
Sinequia posterior de iris	1	0	0	0,01
Inyección ciliar	0	2	0	0,44
Petequias iridales	0	1	0	0,67
Glaucoma	0	1	0	0,67
Vascularización corneal	0	2	1	0,82
Vasos tortuosos	0	1	0	0,44

4.3.6. Severidad de las lesiones oculares en los grupos de estudio. La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada para comparar los grupos con respecto a la gravedad de las lesiones oculares (ausente, leve, severa), con un nivel de confianza del 95%, encontrando que existe diferencia significativa entre la severidad de las lesiones de al menos uno de los grupos ( $P=0.0070$ ). El grupo 3 en el cual se encuentran los pacientes sin alteraciones hematológicas cuenta en su mayoría con caninos con lesiones de tipo



leve y algunos inclusive con ausencia de estas a diferencia de los grupos 1 y 2 en los cuales predominan pacientes con lesiones leves y severas o algunos solo con lesiones severas (ver figura 8). No existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de anemia y trombocitopenia (G1) y el grupo de solo trombocitopenia (G2). Los resultados anteriores pueden indicar que la severidad de las lesiones se relaciona con el nivel plaquetario de los pacientes, si se tiene en cuenta que esta es la alteración hematológica común entre estos dos grupos en los cuales hay mayor presencia de lesiones severas y no hace parte de las anomalías del hemograma del grupo 3 en el cual las lesiones eran más de tipo leve e incluso ausentes. Lo anterior también sugiere que el hematocrito no se relaciona con la gravedad de las lesiones en los ojos.

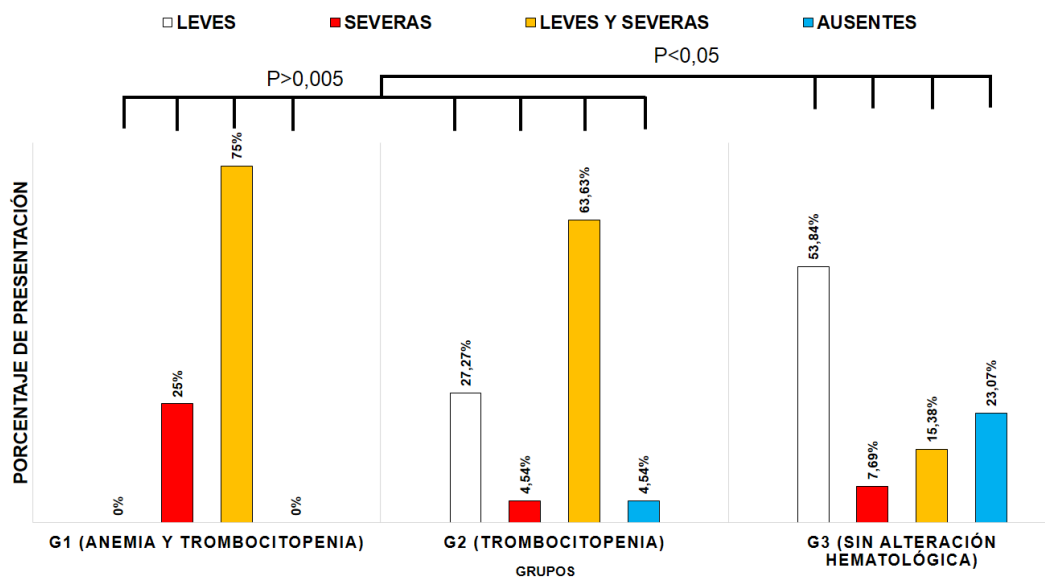


Figura 8. Severidad de las lesiones oculares vs hallazgos hematológicos en pacientes positivos a *Ehrlichia spp.*

Con la finalidad de identificar relación del recuento leucocitario con la severidad de las lesiones oculares, los datos de los pacientes se reagruparon de acuerdo con esta variable y se utilizó igualmente la prueba de Kruskal Wallis, la cual arrojó como

resultado que no existe diferencia significativa en cuanto a la gravedad de las lesiones oftálmicas entre los pacientes con leucopenia o con leucocitosis y los que no presentaron ninguna alteración en el recuento de glóbulos blancos. Lo anterior señala que el nivel de leucocitos tampoco tuvo relación con el compromiso ocular de los pacientes incluidos en el presente estudio.

4.3.7. Relación entre la PIO y las variables hematológicas. El coeficiente de relación de Pearson fue utilizado para buscar relación entre la PIO y las anomalías hematológicas de los pacientes. Al contrastar los niveles plaquetarios con la PIO promedio de los caninos incluidos en este estudio, se obtuvo un coeficiente de  $r=-0,11$  lo que indica una correlación de tipo negativo que sugiere que el aumento de la PIO se relaciona con la disminución del nivel plaquetario y viceversa. Sin embargo, esta relación no es de tipo perfecto lo que sugiere que no hay dependencia total de estas dos variables.

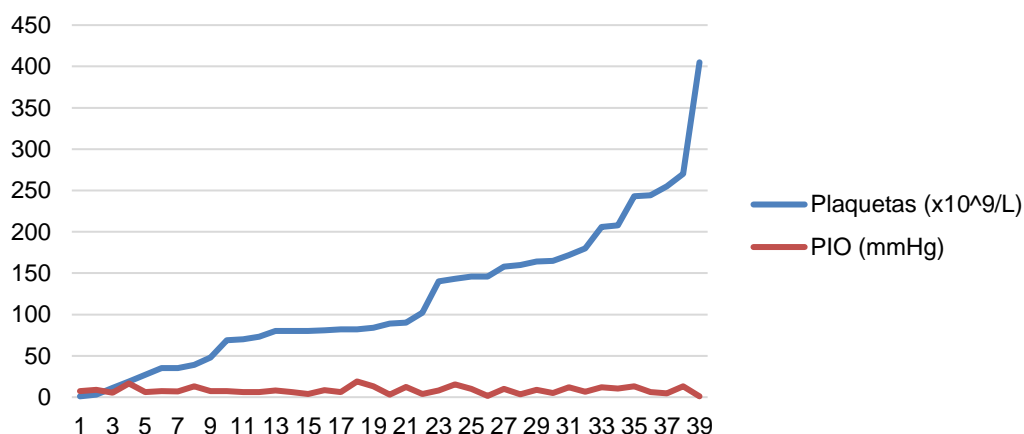


Figura 9. Presión intraocular vs plaquetas en pacientes positivos a *Ehrlichia spp.*

Al contrastar la PIO con el hematocrito de los pacientes se encontró una correlación de tipo positiva no perfecta, con un coeficiente de  $r=0,12$ , es decir que las variables no son totalmente dependientes la una de la otra. La cercanía del coeficiente con 0 muestra que las variables tienen mayor tendencia a ser independientes.

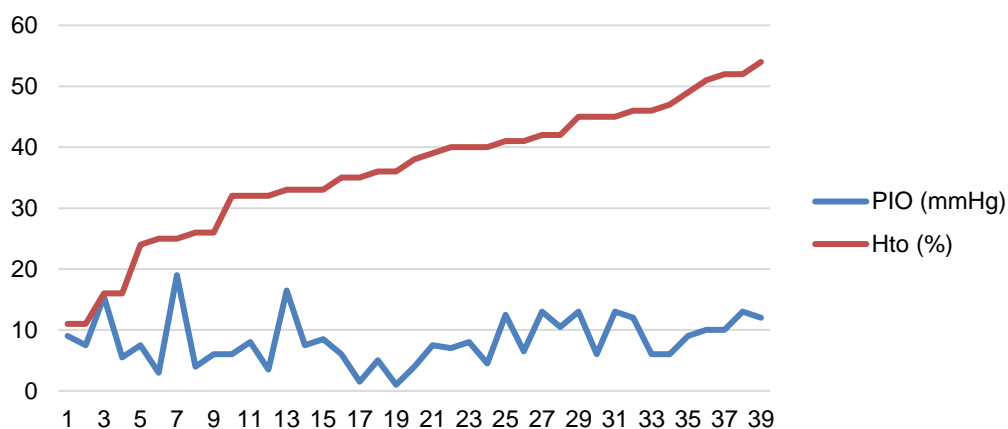


Figura 10. Presión intraocular vs hematocrito en pacientes positivos a *Ehrlichia spp.*

Una correlación negativa presentó la PIO y el recuento leucocitario ( $r=-0,23$ ), señalando que a mayor número de leucocitos las presiones intraoculares disminuyeron y por el contrario a menor número de leucocitos las presiones oculares se registraron más altas en algunos de estos pacientes, pero no en la totalidad de ellos ya que la correlación no es negativa perfecta.

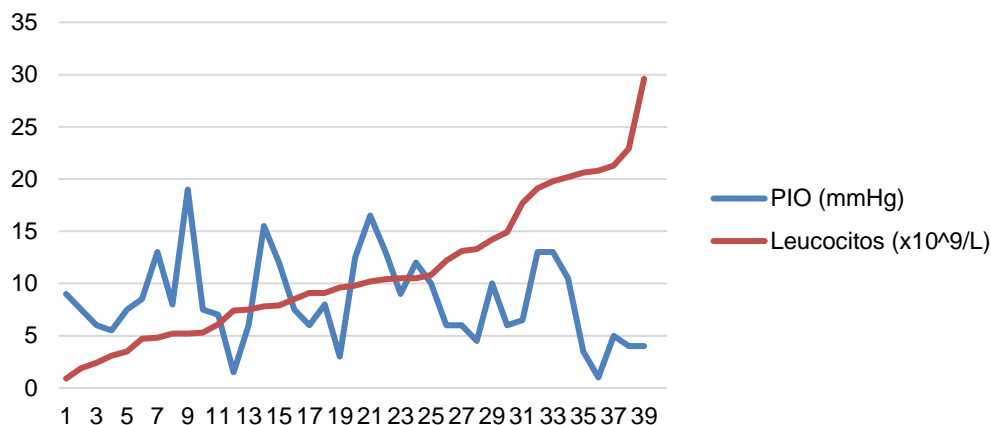


Figura 11. Presión intraocular vs recuento leucocitario en pacientes positivos a *Ehrlichia spp.*

El número de copias del gen TraG por microlitro de muestra de los pacientes, señala el grado de infección con *Ehrlichia sp* que tiene cada uno de ellos y teniendo en cuenta que los grupos 1 y 2 poseen la mayor cantidad de copias/ $\mu$ l, además de ser los caninos con lesiones oculares de mayor severidad, esta variable fue sometida a la prueba de correlación de Pearson junto a la PIO para evidenciar si existe relación directa entre ellas, obteniendo un coeficiente de relación de  $r=-0,26$ ; este resultado es indicativo de que a mayor número de copias/  $\mu$ l del gen TraG, las PIO tuvieron tendencia a disminuir.

La misma prueba fue realizada para identificar relación entre el TLS y el número de copias/ $\mu$ l del gen TraG, obteniendo como resultado que dichas variables fueron completamente independientes en estos 39 pacientes.

## 5. DISCUSIÓN

Se optó por estudiar las alteraciones oculares y su relación con los hallazgos hematológicos en caninos positivos a *Ehrlichia canis*, debido a la frecuencia con que son encontrados los casos de esta enfermedad en la rutina clínica, sus graves consecuencias para la visión y su limitado conocimiento al respecto de la relación de los hallazgos clínico-laboratoriales (Komnenou et al., 2007; Leiva et al., 2005; A. P. Oriá et al., 2004)

El diagnóstico de ehrlichiosis debe hacerse basado en un conjunto de factores ya que esta enfermedad puede mostrar diversas manifestaciones clínicas dependiendo de la fase en que se encuentra. Signos clínicos del animal, pruebas de laboratorio, anamnesis del paciente y exposición a garrapatas puede aumentar la sospecha de enfermedad. Las pruebas serológicas pueden ser de gran utilidad, sin embargo el diagnóstico definitivo solo puede efectuarse visualizando mórulas en extendidos sanguíneos o con la realización de pruebas moleculares que identifiquen secuencias genéticas concordantes con el genoma de la *E. canis* (Harrus & Waner, 2011).

La presentación clásica de la ehrlichiosis en caninos se caracteriza por fiebre, depresión, letargia, pérdida de peso y anorexia con o sin tendencias hemorrágicas (Ettinger & Feldman, 2005), signología que no difiere en el presente estudio y donde otras manifestaciones de la enfermedad como las oculares son poco percibidas por

los propietarios, a excepción de los casos en los que se denota gravedad de la función o morfología ocular como en pacientes con ceguera, edema corneal, secreción ocular y buftalmia. En la presente investigación los 120 caninos incluidos presentaban cuadro clínico típico de CME, y de ellos, tan solo un 5,8% de los pacientes atendidos y que fueron positivos a la enfermedad tuvieron como único motivo de consulta alguna de las alteraciones oculares antes citadas. Diferentes trabajos de investigación reportan hallazgos oftálmicos de ehrlichiosis (Komnenou et al., 2007; Leiva et al., 2005; A. P. Oriá et al., 2004), pero pocos relatan como único motivo de consulta afecciones oculares (Komnenou et al., 2007; Sainz et al., 2015).

Para realizar un diagnóstico confiable de ehrlichiosis, se emplean pruebas rápidas. Como prueba diagnóstica inicial se realizó un ensayo inmunocromatográfico (Anigen® *E. canis/Anaplasma* Ab Test Kit) con el cual se evidenció que el 73,4% de los pacientes eran positivos al contacto con rickettsias como *Ehrlichia canis* y *Anaplasma*, sin embargo, aún con un cuadro clínico presente en todos los perros, 26.6% de ellos no mostraron anticuerpos a ninguno de estos dos patógenos, esto puede indicar la presencia de otros hemoparásitos causantes de un cuadro clínico similar. Colombia reporta una seroprevalencia para *Babesia canis vogeli* de 51,6% y una prevalencia del 5% (Vargas-Hernández et al., 2012a) y en la ciudad de Ibagué ya ha sido reportada la presencia de *Babesia canis* en muestras de perros con cuadros clínicos compatibles con CME pero negativos a la presencia de *E. canis*. (Bermúdez, 2017). Otro hemoparásito que se puede asociar con el cuadro clínico de estos animales es el *Hepatozoon canis*, el cual se ha reportado con una prevalencia 31,8% en el país (Acevedo, Ramírez, & Restrepo, 2009; Correa, 2013; Vargas-Hernandez et al., 2012b). La presentación de signos oculares en los pacientes seronegativos

también ameritó una nueva evaluación clínica encaminada a establecer el diagnóstico definitivo, donde se debió incluir como diagnóstico diferencial para algunos casos la leishmaniasis, porque esta es considerada una enfermedad emergente en la región (Mubayi, Paredes, & Ospina, 2018; Pardo, Cabrera, Becerra, Fuya, & Ferro, 2006; Romero, López, Echeverry, & Rivas, 2008) y debido a que los pacientes cursaron con PIO baja, hiperemia conjuntival, precipitados queráticos, edema cornea, vasos episclerales congestionados, entre otros, signos reportados para infecciones con este protozoo (Brito et al., 2006; Peña et al., 2008; Roze, 2002). Otros hallazgos oculares en estos pacientes permitieron establecer enfermedades oculares primarias y secundarias como diabetes con presentación de cataratas, queratoconjuntivitis seca de tipo cualitativo y conjuntivitis folicular principalmente.

Las diferentes pruebas rápidas o pruebas SNAP basadas en ensayos inmunocromatográficos han sido usadas y comparadas por diferentes autores, encontrando que estas tienen una sensibilidad que oscila entre el 82 y 97% (Bélanger et al., 2002; Davoust et al., 2014). Wong y colaboradores en 2011, efectuaron de manera paralela pruebas SNAP y PCR encontrando un 85% de concordancia entre los dos métodos diagnósticos; de igual manera Carrillo y colaboradores en 2012, realizaron pruebas rápidas y las contrastaron con PCR para poder hacer cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, encontrando en su estudio que, tanto la sensibilidad como la especificidad son de un 50%, con un valor de predicción positivo de 60% y negativo del 40%. En el presente estudio, la concordancia entre la prueba serológica rápida y la PCR fue del 55,7%.

La visualización de mórulas de *Ehrlichia spp.* por citología es otra técnica que puede confirmar el diagnóstico de CME. Las muestras empleadas son obtenidas a

través sangre periférica, capa leucocitaria, aspirados de linfonodos, bazo y médula ósea; las sensibilidades más altas se obtienen en el extendido de capa leucocitaria y en aspirados de linfonodos con un 66% y 60,9% respectivamente (Mylonakis et al., 2003). Contrario a esto, Faria y colaboradores en 2010, solo encontraron una sensibilidad del 5,7% para la capa leucocitaria y señalan que la búsqueda de mórulas es más eficiente en aspirados de bazo con un 48,6% de efectividad debido a que la bacteria permanece alojada en el bazo por más tiempo que en la sangre. El extendido de médula ósea es la técnica citológica más sensible según lo señalado por Makino y colaboradores en 2015 quienes reportaron una tasa de detección del 52%. Los resultados del presente estudio mostraron una tasa de detección del 64% para el frotis de sangre periférica y el de capa blanca al ser realizados de manera simultánea, la sensibilidad específica para cada técnica fue del 43,58% para la sangre periférica y un 33,33% para la capa leucocitaria; esto señala que la utilización de extendidos simultáneos de sangre entera y capa leucocitaria son de gran utilidad para la confirmación de diagnóstico al igual que lo reportado para los aspirados de bazo y médula ósea, pero se generan menores riesgos para el paciente. De acuerdo al reporte de Moreira y Passos en 2005, el hallazgo de mórulas en las diferentes muestras utilizadas depende del tiempo de infección del animal, ya que concluyeron que para encontrar mórulas a nivel de médula ósea deben haber transcurrido 15 días post infección y en sangre periférica a partir de los 11 días, esto dificulta la utilización de esta técnica ya que en infecciones naturales no es posible precisar el tiempo de infección del paciente.

La PCR y la secuenciación son las técnicas más sensibles y específicas para el diagnóstico *Ehrlichia spp.*; para su realización se pueden usar gran variedad de



muestras y dicha técnica puede usarse desde etapas muy tempranas de la infección. Muchas secuencias genéticas han sido usadas como cebadores para la detección del patógeno en los diferentes tejidos, pero es el gen 16S rRNA el más utilizado según lo reportado por los diferentes autores (Campos et al., 2016; Daramola, et al., 2018; Huber et al., 2017; Maekawa et al., 2017; Movilla, et al., 2017; Nazari et al., 2013; Roy, Misra, & Willayat, 2013; Vargas-Hernández et al., 2012a). El diagnóstico molecular en este estudio se realizó con base en un gen que codifica para proteínas tipo VirD4 del T4SS del género *Ehrlichia* estas proteínas se han usado más frecuentemente para estudios de comprensión de la patogenia de la ehrlichiosis humana (Felek et al., 2003; Liu et al., 2013; Ohashi et al., 2002). Otras proteínas del T4SS ya han sido reportadas para diagnóstico de *Ehrlichia canis* específicamente, como es el caso de las VirB9 que son proteínas estructurales del complejo de membrana externa de este sistema de secreción, tal es el caso de la investigación realizada por Kledmanee y colaboradores en 2009 quienes realizaron detección de *E. canis* utilizando como cebador específico para la especie el gen VirB9. Mas recientemente en el año 2014 también se usó este mismo gen para PCR de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia en tiempo real obteniendo una sensibilidad y especificidad del 87,5% y del 100% respectivamente (Kongklieng et al., 2014). El diagnóstico molecular realizado en el presente estudio tuvo una desventaja debido a que la detección que se realizaba no era específica para *E. canis*, sino que aplicaba para todo el género. Desde el punto de vista clínico detectar *Ehrlichia spp.* en muestras de sangre junto con los signos clínicos del paciente confirman el diagnóstico y garantizan el tratamiento del animal ya que este no difiere entre las especies; sin embargo, en esta investigación esto generó un sesgo ya que por ejemplo seropositividad para *Ehrlichia chaffeensis* ha sido

identificada en humanos y animales en el país lo que sugiere la presencia del agente en el entorno y este es uno de los agentes causales de cuadros de ehrlichiosis en caninos (Hidalgo, Vesga, Lizarazo, & Valbuena, 2009; Hidrón, Mu, & Vega, 2014). A pesar de ello, si se tiene en cuenta que la prevalencia de *E. canis* en Colombia es alta, es probable que el patógeno identificado por PCR sea esta rickettsia; adicional a esto, todos los pacientes positivos a PCR fueron seleccionados inicialmente con una prueba rápida en la cual se identificó la presencia de anticuerpos específicos contra *E. canis*.

De los 70 pacientes positivos al contacto con la bacteria en la prueba rápida, solo 39 resultaron positivos a la infección por la prueba molecular, esto puede significar que el paciente estuvo en contacto con la rickettsia y logró eliminarla ya sea por su sistema inmunológico (Breitschwerdt, Hegarty, & Hancock, 1998b; Waner et al., 1997) o por tratamiento con tetraciclinas (Breitschwerdt, Hegarty, & Hancock, 1998a). Una vez eliminado el patógeno los títulos de anticuerpos se pueden mantener en concentraciones altas incluso por meses tal y como lo demostraron Bartsch & Greene en 1996.

En Colombia existe una seroprevalencia general de enfermedades transmitidas por vectores (infección con uno o más agentes patógenos) entre un 30% y un 84% dependiendo de la ciudad; la coinfección más encontrada es entre *E. canis* y *A. phagocytophilum* con una seroprevalencia del 40% en ciudades como Barranquilla y 6% en Medellín. Coinfecciones de *E. canis* con *Borrelia burgdorferi* no han sido reportadas. Los resultados de este estudio arrojaron una seroprevalencia del 15,8% para la coinfección entre *E. canis* y *Anaplasma spp.* Coinfección con *Borrelia burgdorferi* fue encontrada accidentalmente en un paciente, el cual fue testeado con

un SNAP 4DX® (Idexx Laboratorios) proporcionado por el propietario, que mostró contacto con *E. canis* y con *Borrelia burgdorferi*; dicha coinfección fue confirmada al resultar positivo a la PCR para ambos patógenos. A pesar de la presencia de las dos bacterias dicho paciente fue incluido en el estudio porque no hay datos clínicos hasta la fecha de la infección natural en caninos con *Borrelia burgdorferi*. En infecciones experimentales se han documentado signos inespecíficos y no se desarrollan en todos los caninos los cuales pueden ser fiebre, malestar general, claudicación y linfadenopatía; después de semanas o meses los pacientes pueden desarrollar signos articulares, renales y nerviosos (Krupka & Straubinger, 2010; Straubinger, Summers, Chang, & Appel, 1997).

De los 39 pacientes positivos en PCR para *Ehrlichia spp.* el 5,12% mostraron coinfección con *Babesia spp.* la cual se evidenció gracias a la visualización de merozoitos dentro de los eritrocitos. Vargas-Hernández y colaboradores reportaron en el 2012 una seroprevalencia para esta coinfección en Colombia del 46,1%.

Al evaluar las razas con mayor presentación de ehrlichiosis canina en la presente investigación, se estima que pacientes mestizos son los más afectados; esto, a diferencia de otros estudios en los que ha sido demostrado que la raza más susceptible a infecciones por *Ehrlichia* es el Pastor Alemán (Bhadesiya & Raval, 2015; Harrus, Kass, Klement, & Waner, 1997; Kuehn & Gaunt, 1985; Nyindo et al., 1980). La razón de ésta diferencia puede estar asociada a la población sujeto de estudio, puesto que la Clínica de Pequeños Animales de la Universidad Cooperativa de Colombia, es frecuentada por propietarios de caninos cuyo estrato socioeconómico es clasificado entre 1 y 3, donde la compra de mascotas de raza no es una práctica común debido al alto costo que representan, además de considerar que actualmente los propietarios

prefieren prácticas de adopción para la obtención de mascotas y los animales que más se encuentran en la ciudad, de forma similar a otras ciudades del país son los mestizos (Muñoz, Ramírez, & Garcés, 2015)

Alteraciones en el hemograma de pacientes con ehrlichiosis canina incluyen principalmente: trombocitopenia, anemia y leucopenia (Greene, 2000). En el presente estudio, el 10,25% de los pacientes presentaron anemia, 66,6% trombocitopenia, 28,2% leucopenia y 23,07% leucocitosis. Resultados similares a los obtenidos por Carrillo et al., (2012), quien con su trabajo realizado en Colombia demostró que el 10% de los pacientes con sintomatología sugestiva de infección por *Ehrlichia canis* presentaban anemia.

Los resultados obtenidos al realizar el conteo de plaquetas demuestran similitud a los obtenidos por Harrus et al. (1997) y Özata & Ural, (2014) con 73% y 67% respectivamente. Los reportes de trombocitopenia en pacientes caninos infectados por *Ehrlichia* demuestran una amplia variabilidad en los resultados, como puede observarse en los pacientes analizados por Asgarali, Pargass, Adam, Mutani, & Ezeokoli, (2012); Carrillo et al., (2012) y Badillo et al., (2017) que reportan un porcentaje de pacientes con éste hallazgo, del 80.4%, 80% y 48% respectivamente. El recuento plaquetario en estos pacientes varía de acuerdo a la etapa de la enfermedad en que se toman las muestras, puesto que en la etapa aguda puede encontrarse trombocitopenia de moderada a grave, durante la fase subclínica suele presentarse una trombocitopenia leve y en la fase crónica los hallazgos hematológicos sugieren severa trombocitopenia (Harrus & Waner, 2011; Harrus et al., 1997; Waner et al., 1997).

La mayor parte de los pacientes objeto de estudio presentaron leucopenia, dato que, al ser contrastado con los resultados del hematocrito y conteo de plaquetas, sugieren que los pacientes se encontraban en su mayoría en fase aguda o subclínica de la enfermedad (Harrus & Waner, 2011).

De acuerdo con los hallazgos hematológicos de los pacientes que incluyeron trombocitopenia, anemia, alteraciones en el recuento de glóbulos blancos y algunos caninos que no presentaron ninguna alteración, se establecieron grupos de estudio para la comparación entre ellos de las afecciones oculares encontradas.

El 89,74% de los pacientes positivos a *Ehrlichia spp.* presentaron alteraciones oculares, resultado que difiere con lo observado por Leiva et al. (2005) quienes demostraron que tan solo el 37% de los pacientes confirmados como positivos a la infección presentaban afecciones oftálmicas. Cabe resaltar que los resultados obtenidos por este grupo de investigación en España, fueron obtenidos por la aplicación de la técnica de ELISA indirecta, donde el diagnóstico de la infección se basa en la titulación de anticuerpos, mas no en la detección del agente lo que no asegura que los pacientes estuvieran infectados en el momento del estudio (Lin, 2015). Nuestros resultados fueron obtenidos a partir de la confirmación del agente causal a través de la técnica de PCR en tiempo real, lo que indica infección latente en el momento de la toma de las muestras (Garibyan & Avashia, 2014).

Los reportes de animales infectados con *Ehrlichia* que presentan alteraciones oculares no son homogéneos: 50% (Martin, 1999) en animales inoculados experimentalmente, 37% (Leiva et al., 2005), 33,33% (Komnenou et al., 2007), 10-15% (Martin, 1999) en infecciones naturales. Resultados que discrepan con los encontrados en el presente estudio en el cual se presentaron alteraciones oculares en el 89% de

los caninos. Tales discrepancias pueden deberse al hecho de que algunos autores no establecen claramente la fase de la enfermedad en la que estaban los animales objeto de estudio y en la fase aguda se ha demostrado que hay mayor presentación de signos oculares (Martin, 1999). Otra posible causa de esta diferencia se debe a las condiciones en las cuales fueron obtenidos los resultados, ya que en los animales infectados experimentalmente, la prevalencia de alteraciones oculares es notablemente inferior, pues son animales que están en ambiente controlado, sin actividad física y sin factores medioambientales que pudieran propiciar mayor gravedad de las lesiones (Munhoz et al., 2012), mientras que nuestros pacientes fueron pacientes clínicamente enfermos y la enfermedad fue adquirida en su medio natural.

Resultados similares al presente estudio fueron reportados por Oriá et al., (2008), quien relató un porcentaje de presentación de las alteraciones oculares en pacientes con la enfermedad diagnosticados a través de la técnica de dot-blot linked immunoassay fue del 86,27%. Tal similitud puede deberse al número de pacientes analizado en los dos estudios: entre 39 y 44 y a que en los dos casos los pacientes fueron rigurosamente identificados a través de al menos dos técnicas laboratoriales distintas.

Cabe resaltar también que los demás trabajos que reportan resultados de menor frecuencia de alteraciones oculares han sido retrospectivos, donde no siempre la evaluación de los pacientes fue realizada por un oftalmólogo veterinario (Komnenou et al., 2007; Leiva et al., 2005)

La uveítis es la alteración inflamatoria de las estructuras del tracto uveal y puede desencadenarse como consecuencia de enfermedades sistémicas; es considerada

como una importante manifestación ocular de CME, debido a la vasculitis, deposición de inmunocomplejos y hemorragias oculares de una o varias estructuras oculares (Gelatt, 2014; Stiles, 2011). Los inmunocomplejos se depositan en los vasos sanguíneos locales y promueven el incremento de la permeabilidad vascular y en general, un desequilibrio de las barreras oculares, con lo cual hay un aumento del flujo de células inflamatorias en el tracto uveal (Gelatt, 2014; Harrus et al., 2001).

La totalidad de los pacientes involucrados en el presente estudio presentaron disminución de la presión intraocular, hallazgo común en las uveítis, puesto que la inflamación de la úvea anterior conlleva a la reducción de la secreción activa del humor acuoso (Cook, Peiffer, & Landis, 2008; Stiles, 2000).

Otras alteraciones oculares también fueron evidenciadas en los pacientes: hiperemia conjuntival, edema corneal, hemorragias retinianas, edema perivascular, precipitados queráticos, iris bombé, entre otras también reportadas por Hakanson & Forrester, (1990), Mylonakis et al., (2004) y Oriá et al., (2008). Estas alteraciones incluyen uveítis anterior y posterior con presencia o no de hemorragias derivadas de la trombocitopenia que fue encontrada también como un hallazgo laboratorial frecuente.

El grupo de pacientes con trombocitopenia y anemia manifestaron alteraciones oculares severas y leves. Alteraciones severas predominaron y el edema perivascular adquirió gran relevancia debido a que es la alteración de fondo de ojo que se presenta con mayor frecuencia. El edema perivascular, reportado también en otros órganos, principalmente en el pulmón, ocurre como consecuencia de la anemia y de las hemorragias intersticiales lo que desencadena hipotensión y a su vez, síndrome de isquemia reperfusión (Engler, Schmid-Schönbein, & Pavelec, 1982).

La hipotensión sistémica puede considerarse como un hallazgo ocasional en humanos con *E. chaffeensis* y en caninos con *E. canis*, principalmente en aquellos en los que el hematocrito es inferior a 15% (Havens, Kinnear, & Mato, 2012; Peda, Betance, Soto, Fraites, & Verma, 2014; Tal & Shannahan, 1995). Esta hipotensión en pacientes caninos tiene alta asociación con alteraciones cardíacas, debido a que el agente *E. canis* desencadena cardiomiopatías (Kittleson, 1998), derivadas de la anemia severa inicial observada en el cuadro clínico y que los asocia con una mayor probabilidad de riesgo de daño cardíaco (Diniz, Morais, Breitschwerdt, & Schwartz, 2008). Toda ésta fisiopatología además puede conllevar al síndrome de isquemia-reperfusión que genera a su vez el compromiso de varios órganos por los mediadores que se generan y causan al mismo tiempo lesiones remotas o lesiones en órganos distantes (Moore, Muir, & Granger, 1995) como la retina, donde ya han sido reportados daños retinianos derivados de enfermedades sistémicas como la arterioesclerosis en humanos (Yokota et al., 2011) o del mismo síndrome originado en el ojo de forma primaria, como consecuencia de glaucoma, oclusión de la arteria retinal central u oclusión de la arteria oftálmica (Osborne, Casson, Wood, Chidlow, & Graham, 2004). Para el conocimiento del autor, no existen estudios al respecto del síndrome de isquemia reperusión en el que se haya asociado a *E. canis* como causa inicial y sus posteriores lesiones remotas en un órgano como el ojo, pero estos resultados pueden constituir una base inicial para su estudio, donde se debieran considerar las cardiomiopatías de los pacientes infectados con la rickettsia, el síndrome de isquemia reperusión y la función retiniana.

Alteraciones oculares de tipo hemorrágico también fueron observadas con frecuencia en animales con anemia y trombocitopenia, dentro de las que se destacan



las petequias conjuntivales, hemorragias retinianas y desprendimiento de retina, de forma similar a lo reportado por Swanson, (1990); Komnenou et al.(2007); Leiva et al. (2005) y Oriá et al. (2008). Existen diferencias notables entre los resultados del presente estudio y los dos últimos autores reportados, específicamente en lo que hace referencia a la frecuencia de presentación de las principales lesiones de tipo hemorrágico puesto que los valores obtenidos fueron mayores que los referenciados. Cabe anotar que estos trabajos fueron realizados con base en el diagnóstico serológico por valoración de anticuerpos, donde no se evidencia la enfermedad de forma activa, diferente de la evaluación reportada en el presente trabajo la cual se realizó por PCR, técnica que asegura la presencia del patógeno en el animal, por tanto, los valores hematológicos de los pacientes pueden ser diferentes hablando específicamente del recuento plaquetario, pero los autores no los reportan (Leiva et al., 2005; A. Oriá et al., 2008). Komnenou et al. (2007) reporta valores similares a los encontrados en este estudio ya que el 69,9% de los animales estudiados presentaron los mismos signos oculares (algunos de ellos con mayor frecuencia de presentación) acompañados de alteraciones plaquetarias. Trombocitopenia o disfunción plaquetaria son frecuentemente las causas de éstas alteraciones oculares (Harrus et al., 1998, 1996; Lovering et al., 1980; Woldehiwet & Ristic, 1993).

Disfunción plaquetaria ocurre principalmente en el estado agudo de la ehrlichiosis canina y puede contribuir a las tendencias hemorrágicas observadas en la enfermedad. De la misma forma han sido encontrados anticuerpos anti plaquetas que actúan contra glicoproteínas plaquetarias y también pueden jugar un importante rol en la agregación plaquetaria (Harrus, Waner, et al., 1996). Hiperviscosidad sanguínea secundaria a gammapatía monoclonal, elevación de la presión oncótica y vasculitis

adicionalmente también son factores que se incluyen en la patogénesis de los sangrados oculares (Harrus et al., 1998).

Los mecanismos por los que *E. canis* causa trombocitopenia incluyen incremento del consumo plaquetario, debido a los cambios inflamatorios en los endotelios vasculares, incremento del secuestro esplénico de plaquetas y destrucción inmunológica o injuria (Kakoma, Carson, Stephenson, Hildebrandt, & Huxsoll, 1978; Pierce, Marrs, & Hightower, 1977; Smith, Ristic, Huxsoll, & Baylor, 1975).

Los pacientes positivos a *Ehrlichia spp.* con anemia y trombocitopenia incluidos en el estudio mostraron una significativa predisposición a desarrollar sinequias de iris en comparación con los animales que no presentaron alteraciones hematológicas o con aquellos que presentaron únicamente trombocitopenia. Este hallazgo se encuentra relacionado con la presentación de uveítis anterior crónica resultante de la acumulación de desechos tóxicos y mediadores inflamatorios dentro del humor acuoso que hacen que las márgenes pupilares se vuelvan adhesivas y puedan adherirse a la córnea o a la cápsula anterior del cristalino (Gwinn, 1988). Los animales clasificados dentro de este grupo son animales con pancitopenia y esta puede ser la causa de la mayor predisposición a una uveítis anterior crónica, puesto que además de la anemia y la trombocitopenia, fueron animales con leucopenia, situación que los hace susceptibles desde el punto de vista inmunológico a la continua presencia del agente etiológico de la enfermedad, lo que resulta en inflamación continua de la úvea; los mediadores inflamatorios liberados por este proceso incitan a cambios oculares clásicos los cuales incluyen las sinequias (Millichamp & Dziezyc, 1991). Frecuentemente las uveítis no son detectadas o son subestimadas por los veterinarios clínicos, principalmente si los pacientes se encuentran en fases subclínicas de la

ehrlichiosis y estas al no ser tenidas en cuenta dentro de la terapéutica de la afección general pasan a ser uveítis crónicas (Leiva et al., 2005).

En este estudio, los pacientes con trombocitopenia como manifestación hematológica de la enfermedad, a nivel ocular son principalmente acometidos por lesiones severas y leves con una importante presentación de lesiones leves tales como hiperemia conjuntival que fue la lesión más frecuentemente observada, además de ser pacientes propensos al desarrollo de petequias conjuntivales, como indicativo de uveítis anterior (Gelatt, 2014), lo que puede llevar a concluir que pacientes con trombocitopenia por si sola como hallazgo hematológico suelen presentar alteraciones oculares menos graves que los pacientes que presentan pancitopenia.

Oriá et al. (2008) sugirió que los resultados hematológicos no siempre corresponden con el nivel de compromiso oftalmológico en pacientes con seropositividad para *E. canis*; contrario a este estudio, una relación entre la trombocitopenia y las lesiones oculares de tipo severa fue establecida por Shelah-Goraly et al. (2009) en caninos con anemias y trombocitopenias originadas por diferentes patologías, el autor reportó que la presencia de lesiones en los ojos se relacionaba solo con trombocitopenia pero no con anemia.

Pacientes positivos a *Ehrlichia spp.* sin alteraciones hematológicas también presentaron uveitis y alteraciones leves o algunos no presentaron alteraciones oculares, hallazgo que denota la influencia de un sistema inmunológico competente en un órgano como el ojo, logrando inferir que la uveítis es la más importante manifestación ocular inicial de una enfermedad sistémica como la ehrlichiosis al menos en regiones donde la enfermedad es considerada endémica. Otros estudios como el de Leiva et al., (2005) también reportan a la uveitis como la alteración más frecuente

en caninos con CME. A pesar de ello la uveítis en estos pacientes, no se ha considerado de valor pronóstico (Shipov, Klement, Reuveni-Tager, Waner, & Harrus, 2008).

La presión intraocular se encuentra altamente relacionada con el recuento leucocitario, puesto que mientras más alto el recuento, la presión intraocular disminuye, lo que significa que hay uveítis en pacientes tendientes a la leucocitosis y aunque de acuerdo al autor es la primer vez que se hace este tipo de correlación sistémica-ocular, corrobora lo antes establecido donde histológicamente se conoce que las uveítis presentan una predominante respuesta de glóbulos blancos, principalmente de polimorfonucleares (Chang, McCluskey, & Wakefield, 2005; Ohta, Yamagami, Wiggert, Dana, & Streilein, 2002), que para esta enfermedad son estimulados por la *Ehrlichia* quien por vía sanguínea invade tejidos oculares lo que conlleva a injuria tisular en la que se encuentran asociados procesos quimiotácticos y mediadores inflamatorios, donde las prostaglandinas son los más poderosos mediadores específicamente para tejidos oculares donde causan miosis por efecto directo en la pupila, hiperemia y alteraciones en la presión intraocular (Van Der Woerd & Acvo, 2001).

## 6. CONCLUSIONES

La prueba rápida o SNAP son es de gran ayuda en la rutina clínica cuando se tiene una fuerte sospecha de infección por *Ehrlichia spp.* fundamentada en el cuadro clínico, la anamnesis y los resultados laboratoriales del animal, puesto que esta por si sola no confirma el diagnóstico; se requiere de técnicas que permitan visualizar la bacteria o que logren identificar secuencias genéticas correspondientes al genoma de la *Ehrlichia*.

La PCR es el método más efectivo para el diagnóstico de ehrlichiosis canina, sin embargo, en algunas ciudades del país como Ibagué, no existe una oferta comercial de esta técnica, lo que hace que el acceso por parte de los veterinarios y los propietarios se dificulte debido al costo y necesidad de transporte de las muestras; por esta razón la búsqueda de técnicas alternativas pero efectivas se hace necesaria para optimizar el proceso de diagnóstico de la enfermedad.

La citología para la visualización de mórulas de *Ehrlichia* es una de las técnicas más eficientes para la confirmación del diagnóstico; el presente estudio señala que la realización de frotis de sangre periférica y el extendido de capa leucocitaria simultáneamente tienen una tasa de detección del 64%, la cual supera la reportada para los aspirados esplénicos que han demostrado ser uno de los métodos de citología más eficientes. Los resultados de esta investigación convierten a la asociación de

estos extendidos en una buena opción para el acercamiento al diagnóstico definitivo de la ehrlichiosis canina en situaciones donde la realización de PCR sea dificultosa.

En el presente estudio el 100% de los pacientes presentó cuadros de uveítis; pese a esto, las manifestaciones oculares de esta inflamación son poco percibidas por los veterinarios y/o propietarios, por lo cual, frecuentemente dentro del tratamiento sistémico de la infección, la uveítis no es objetivo terapéutico pudiendo llevar al paciente a un cuadro de uveítis crónica o glaucoma. Adicional a esto, al considerar que éste fue el hallazgo más frecuente entre todos los pacientes objeto de estudio, incluso en el grupo sin alteraciones hematológicas, puede afirmarse que la uveítis es la manifestación ocular más temprana de ehrlichiosis canina.

Los resultados muestran una asociación significativa entre la trombocitopenia y las lesiones oculares en los perros infectados. La gravedad de las lesiones oculares se asoció de forma significativa con el recuento plaquetario, pero no se encontró una asociación significativa con otros valores del hemograma. Sin embargo, los caninos que adicionalmente presentaron anemia y leucopenia fueron los que mostraron lesiones de mayor severidad; esto indica que el grado compromiso oftalmológico puede estar relacionado con cuadros crónicos de la enfermedad ya que en esta fase es donde se observa con frecuencia disminución de todas las líneas celulares.

El recuento leucocitario se correlaciona negativamente con la PIO, por lo cual se concluye que, a mayor número de leucocitos, las presiones intraoculares disminuyen y por el contrario a menor número de leucocitos las presiones oculares son mayores. Lo anterior sirve de sustento para que los veterinarios contemplen incluir colirios antiinflamatorios en la terapia de la ehrlichiosis, en los casos en los que el recuento de glóbulos blancos se encuentre elevado.

De acuerdo con los resultados de este estudio se puede inferir que el cuadro hemático es una buena herramienta para predecir el compromiso oftalmológico de los pacientes infectados con *Ehrlichia spp.* ya que pacientes con cambios en el hemograma como trombocitopenia, anemia y leucopenia, tienen una mayor predisposición a desarrollar lesiones oculares severas que pueden tener como consecuencia la pérdida parcial o total de la visión; por lo tanto, este examen de laboratorio puede ayudar al clínico a realizar una terapéutica más eficiente e integral contra la infección.

## 1. LISTA DE REFERENCIAS

- Acevedo, S., Ramírez, M., & Restrepo, L. (2009). Uveítis y glaucoma asociados a infección por *Hepatozoon canis*: reporte de un caso. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(3), 287–295.
- Aguiar, D. M. (2014). Divergence of the TRP36 protein (gp36) in *Ehrlichia canis* strains found in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases, Letter to*, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.10.003>
- Aguiar, D. M., Hagiwara, M. K., Labruna, M. B., & Mato, U. F. De. (2008). In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 489–493.
- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., & Rodri, F. (2004). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain, 125, 365–372.
- Alho, A. M., Lima, C., Latrofa, M. S., Colella, V., Ravagnan, S., Capelli, G., ... Otranto, D. (2017). Molecular detection of vector-borne pathogens in dogs and cats from Qatar. *Parasites & Vectors*, 10(298), 1–5.
- Allegoa, L. S. O., Lullb, J. L., Ssoc, M. O., Egartya, B. H., & Reitschwerdta, E. B. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37, 231–244.
- Almazán, C., González-álvarez, V. H., Fernández, I. G., Mera, D., Cabezas-cruz, A., Rodríguez-martínez, R., & De, J. (2015). Molecular identification and characterization of *Anaplasma*



- platys and Ehrlichia canis in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*.
- Alves, R., Levenhagen, M., Levenhagen, M., Rieck, S., Labruna, M., & Beletti, M. (2014a). The spreading process of Ehrlichia canis in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Veterinary Microbiology*, 168(2–4), 442–446.
- Alves, R., Rieck, S., Ueira-vieira, C., Labruna, M., & Beletti, M. (2014b). Isolation, in vitro propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an Ehrlichia canis strain from southeastern Brazil. *Journal of Veterinary Science*, 15(2), 241–248.
- Asgarali, Z., Pargass, I., Adam, J., Mutani, A., & Ezeokoli, C. (2012). Ticks and Tick-borne Diseases Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to Ehrlichia canis in North Trinidad. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(4), 207–211.
- Badillo, M., Díaz, A., Orozco, C., & Lavallo, R. (2017). Infection by Ehrlichia canis and Anaplasma sp . in dogs attended in veterinary clinics , Barranquilla , Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 22, 6023–6033.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S., & Schlesinger, Y. (2009). Longitudinal quantification of Ehrlichia canis in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*, 136, 321–325.
- Baneth, G., Waner, T., Koplak, A., Weinstein, S., & Keysary, A. (1996). Survey of Ehrlichia canis antibodies. *The Veterinary Record*, 26–29.
- Bartsch, R. C., & Greene, R. T. (1996). Post-Therapy Antibody Titers in Dogs With Ehrlichiosis: Follow-Up Study on 68 Patients Treated Primarily With Tetracycline and/or Doxycycline. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(4), 271–274.
- Bélangier, M., Sorenson, H. L., France, M. K., Bowie, M. V, Barbet, A. F., Edward, B., ...

- Breitschwerdt, E. B. (2002). Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of Ehrlichia canis Infections in Dogs Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of Ehrlichia canis Infections in Dogs † Myriam Be. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3506–3508.
- Bermúdez, A. (2017). *Detección de cepas de Babesia canis en caninos con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo a través de herramientas moleculares*. Universidad de La Salle.
- Bhadesiya, C. M., & Raval, S. K. (2015). Hematobiochemical changes in ehrlichiosis in dogs of Anand region, Gujarat. *Veterinary World*, 8(6), 713–717.
- Bottari, N. B., Crivellenti, L. Z., Moresco, R. N., Santana, A. E., Tonin, A. A., Tinucci-costa, M., & Da, A. S. (2016). Microbial Pathogenesis Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by Ehrlichia canis: Acute and subclinical disease. *Microbial Pathogenesis*, 92, 26–29.
- Brandão, P., De Andrade, T., Santos, F., Alberto, R., Albuquerque, G., Díaz, A., ... Lessa, F. (2015). Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 29(6), 115–121.
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., & Hancock, S. I. (1998a). Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two Ehrlichia canis Strains. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 42(2), 362–368.
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., & Hancock, S. I. (1998b). Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with Ehrlichia canis , or Bartonella vinsonii. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2645–2651.
- Breitschwerdt, E. B., Woody, B. J., Zerbe, C. A., De Buyscher, E. V., & Barta, O. (1987). Monoclonal Gammopathy Associated With Naturally Occurring Canine Ehrlichiosis. *Journal*

*of Veterinary Internal Medicine*, 1(1), 2–9.

- Brito, F. L. C., Alves, L. C., Maia, F. C. L., Santos, E. S. C., Laus, J. L., & Meunier, I. M. J. (2006). Ocular alterations in dogs naturally infected by. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(5), 768–775.
- Bulla, C., Takahira, R. K., Araujo, J. P., AparecidaTrinca, L., Lopes, R. S., & Wiedmeyer, C. E. (2004). The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*, 35(1), 141–146.
- Cabezas, A., Zwegarth, E., Flavio, M., Ribeiro, B., Angelica, J., Fuente, J. De, ... Passos, F. (2012). New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus* ( *Boophilus* ) *microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasites & Vectors*, 5(291), 1–12.
- Campos, L., Ábrego, L., Solórzano, A., Alberti, A., Tore, G., Zobba, R., ... Dolz, G. (2016). Molecular detection and identification of Rickettsiales pathogens in dog ticks from Costa Rica. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(6), 1198–1202.
- Carrillo, L. M., Betancur, S., Roldán, D., Jaramillo, E., Galeano, D., Loaiza, T., & Giraldo, C. (2012). Implementation of a PCR-based method for the diagnosis of *Ehrlichia* spp , in canine in Medellin ( Colombia )\*. *Revista CES*, 7(2), 38–46.
- Cartagena, L. M., Ríos, L. A., & Cardona, J. (2015). Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín , 2012-2014. *Revista de Medicina Veterinaria*, (29), 51–62.
- Chang, J. H., McCluskey, P. J., & Wakefield, D. (2005). Acute Anterior Uveitis and HLA-B27. *Survey of Ophthalmology*, 50(4).
- Cheng, Y., Liu, Y., Wu, B., Zhang, J., Gu, J., Liao, Y., & Wang, F. (2014). Proteomic Analysis of

the Ehrlichia chaffeensis Phagosome in Cultured DH82 Cells. *PLoS One*, 9(2).

Cicuttin, G., De Salvo, M., & Gury, F. (2016). Molecular characterization of Ehrlichia canis infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 954–957.

Collins, N. E., Liebenberg, J., Villiers, E. P. De, Brayton, K. A., Faber, F. E., Heerden, H. Van, ... Allsopp, B. A. (2006). The genome of the heartwater agent Ehrlichia ruminantium contains multiple tandem repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 838–843.

Cook, C. S., Peiffer, R. L., & Landis, M. L. (2008). Clinical basic science. In R. P. S. Petersen-Jones (Ed.), *Small Animal Ophthalmology: A Problem-Oriented Approach* (4th ed., pp. 1–13). Philadelphia: Saunders Ltd.

Correa C. (2013). La ayuda diagnóstica es importante: caso de Hepatozoon spp. *Biosalud*, 12(2), 121–126.

Da Silva, A. S., Munhoz, T. D., Faria, J. L. M., Machado, R. Z., Luz, N. C., Vargas-he, G., ... Tinucci-costa, M. (2013). Influence of experimental canine ehrlichiosis on the E-ADA activity and purine levels in serum and possible functional correlations with pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 166(3–4), 602–606.

Daramola, O., Takeet, M., Oyewusi, I., Oyekunle, M., & Talabi, A. (2018). Detection and Molecular Characterisation of Ehrlichia canis in Naturally Infected Dogs in South West Nigeria. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(1), 85–95.

Das, M., & Konar, S. (2013). Clinical and hematological study of canine Ehrlichiosis with other hemoprotozoan p1. Das M, Konar S. Clinical and hematological study of canine Ehrlichiosis with other hemoprotozoan parasites in kolkata, west bengal, india. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(11), 913–915.

- Davoust, B., Parzy, D., Demoncheaux, J., Tine, R., Diarra, M., Marié, J., & Mediannikov, O. (2014). Usefulness of a rapid immuno-migration test for the detection of canine monocytic ehrlichiosis in Africa. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(1), 31–37.
- Day, M. J. (2011). The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 4(1), 48.
- Diniz, P. P. V. P., Morais, H. S. ., Breitschwerdt, E. B., & Schwartz, D. S. (2008). Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1136–1143.
- Donatien, A., & Letosquard, F. (1935). Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 28, 418–419.
- Donatien, A., & Letosquard, F. (1937). State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie Institut Pasteur d'Algérie*,.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. J., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., ... Rurangirwa, F. R. (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 co. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2001), 2145–2165.
- Dunphy, P. S., Luo, T., & McBride, J. W. (2014). Ehrlichia Moonlighting Effectors and Interkingdom Interactions with the Mononuclear Phagocyte. *Microbes and Infection*, 15(0), 1–20.
- Elias, E. (1991). Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of E.canis. *Journal of Small Animal Practice*, 33, 540–543.

- Engler, R. L., Schmid-Schönbein, G., & Pavelec, R. (1982). Leukocyte Capillary Plugging in Myocardial Ischemia and Reperfusion in the Dog. *American Journal of Pathology*, 111(1), 98–111.
- Ettinger, S., & Feldman, E. (2005). Diseases of the dog and cat. In Elsevier Saunder (Ed.), *Veterinary Internal Medicine* (6th ed., pp. 632–636).
- Faria, J. L. M., Dagnone, A. S., Munhoz, T. D., João, C. F., Biscola, W. A., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2010). Ehrlichia canis morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 2961, 98–102.
- Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., João, C. F., Vargas-Hernández, G., André, M. R., Adriano, W., ... Tinucci-costa, M. (2011). Ehrlichia canis ( Jaboticabal strain ) induces the expression of TNF-  $\alpha$  in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 2961, 71–74.
- Felek, S., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2003). Sequence and Expression Analysis of virB9 of the Type IV Secretion System of Ehrlichia canis Strains in Ticks , Dogs , and Cultured Cells. *Infection and Immunity*, 71(10), 6063–6067.
- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M., & Jongejan, F. (2013). Transmission of Ehrlichia canis by Rhipicephalus sanguineus ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary Parasitology*, 197(3–4), 595–603.
- Frank, J. R., & Breitschwerdt, E. B. (1999). A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13(3), 194–201.
- Frezoulis, P. S., Angelidou, E., Karnezi, D., Oikonomidis, I. L., Kritsepi, M., Kasabalis, D., & Mylonakis, M. E. (2017). Canine pancytopenia in a Mediterranean region : a retrospective

- study of 119 cases ( 2005 to 2013 ). *Journal of Small Animal Practice*, 58(July), 395–402.
- Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Morgat, A., Eychenie, S., Kandassamy, Y., ... Martinez, D. (2006). Comparative Genomic Analysis of Three Strains of Ehrlichia ruminantium Reveals an Active Process of Genome Size Plasticity †. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2533–2542.
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2014). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–8.
- Gelatt, K. N. (2014). Canine Anterior Uvea: Diseases and Surgery. In K. N. Gelatt. (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology* (3<sup>o</sup>, pp. 276–300). John Wiley & Sons.
- Gillespie, J. J., Brayton, K. A., Williams, K. P., Diaz, M. A. Q., Brown, W. C., Azad, A. F., & Sobral, B. W. (2010). Phylogenomics Reveals a Diverse Rickettsiales Type IV Secretion System. *Infection and Immunity*, 78(5), 1809–1823.
- Gillespie, J. J., Phan, I. Q. H., Driscoll, T. P., Guillotte, M. L., Lehman, S. S., Rennoll-bankert, K. E., ... Azad, A. F. (2016). The Rickettsia type IV secretion system : unrealized complexity mired by gene family expansion. *Pathogens and Disease*, 74, 1-13.
- Goncalves, L., & Ibarra, A. (2010). Adenosin deaminasa como molécula coestimuladora y marcador de inmunidad celular . *Investigación Clínica*, 51(4), 561–571.
- González, A. M., Rojas, E. F., Pulido-Medellín, M. O., & García, D. J. (2013). Correlación entre hemograma y frotis sanguíneo para determinar E . canis en la vereda Peñitas de Puente Nacional Correlation between blood count and blood smear to determine E . canis in the Peñitas path of Puente Nacional. *Ciencia y Agricultura*, 10(1), 17–23.
- Gottlieb, J., André, M., Soares, J., Gonçalves, L., de Oliveira, M., Costa, M. M., ... Botelho, M. I. (2016). Rangelia vitalii, Babesia spp. and Ehrlichia spp. in dogs in Passo Fundo , state of Rio Grande do Sul , Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 2961(2), 172–178.

- Gould, D. J., Murphy, K., Rudorf, H., & Crispin, S. M. (2000). Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *The Journal of Small Animal Practice*, 41(6), 263–265.
- Greene, C. E. (2000). *Enfermedades infecciosas de perros y gatos*. (Intermédica SA, Ed.) (2°). Philadelphia.
- Groves, M., Dennis, G., & Amyx, H. (1975). Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). *Am J Vet Res*, 937–940.
- Guillevin, L., Shoenfeld, Y., Belizna, C. C., & Hamidou, M. A. (2009). Infection and vasculitis. *Rheumatology*, (March), 475–482.
- Gutierrez, C., Perez, L., & Agrela, I. (2016). Ehrlichiosis canina. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 28(4), 641–665.
- Gwinn, R. (1988). Anterior uveítis: diagnosis and treatment. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 3(1), 33–39.
- Hakanson, N., & Forrester, S. D. (1990). Uveitis in the Dog and Cat. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20(3), 715–735.
- Harrus, S. (2015). Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *The Veterinary Journal*.
- Harrus, S., Alleman, A. R., & Bark, H. (2002). Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis. *Veterinary Microbiology*, 86, 361–368.
- Harrus, S., Day, M. J., Waner, T., & Bark, H. (2001). Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia



- canis. *Veterinary Microbiology*, 83(4), 343–349.
- Harrus, S., Kass, P., Klement, E., & Waner, T. (1997). Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record*, 141(14), 360–363.
- Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I., & Waner, T. (1998). Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by Ehrlichia canis infection. *Veterinary Parasitology*, 78(2), 155–160.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. *The Veterinary Journal*, 292–296.
- Harrus, S., Waner, T., Eldor, A., Zwang, E., & Bark, H. (1996). Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Rec*, 139, 290–293.
- Harrus, S., Waner, T., Weiss, D. J., Keysary, A., & Bark, H. (1996). Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51(1–2), 13–20.
- Harrus, S., Warier, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H., & Bark, H. (1996). Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 66, 241–249.
- Hasegawa, Y., Hagiwara, M. K., Kohayagawa, A., & Branda, L. P. (2006). Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 78–81.
- Havens, N. S., Kinnear, B. R., & Mato, S. (2012). Fatal Ehrlichial Myocarditis in a Healthy Adolescent : A Case Report and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 113–114.
- Hidalgo, M., Vesga, J., Lizarazo, D., & Valbuena, G. (2009). A survey of antibodies against

- Rickettsia rickettsii and Ehrlichia chafeensis in domestic animals from a rural area of Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), 1029–1030.
- Hidrón, A., Mu, F., & Vega, J. (2014). Primer caso de ehrlichiosis monocítica humana reportado en Colombia. *Infectio*, 18(4), 162–166.
- Higa, A., Zacarias, R., Ferro, J., Bahia, M., Lazaros, A., André, M. R., & Baldani, C. (2010). Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using Ehrlichia canis p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 19(2), 75–79.
- Hoskins, J., Barta, O., & Rothschmitt, J. (1983). Serum hyperviscosity syndrome associated with Ehrlichia canis infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(9), 1011–1012.
- Huber, D., Reil, I., Duvnjak, S., Jurkovi, D., Luka, D., Pilat, M., ... Beck, R. (2017). Molecular detection of Anaplasma platys , Anaplasma phagocytophilum and Wolbachia sp . but not Ehrlichia canis in Croatian dogs. *Parasitology Research*, 116(11), 3019–3026.
- Huxsoll, D. (1976). Canine Ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia):A review. *Elsevier Scientific Publishing Company*, 49–60.
- Kaewmongkol, G., Lukkana, N., Yangtara, S., Kaewmongkol, S., Thengchaisri, N., Sirinarumit, T., ... Fenwick, S. G. (2017). Association of Ehrlichia canis, Hemotropic Mycoplasma spp. and Anaplasma platys and severe anemia in dogs in Thailand. *Veterinary Microbiology*, (201), 195–200.
- Kakoma, I., Carson, C. A., Stephenson, E., Hildebrandt, P., & Huxsoll, D. (1978). Platelet Migration Inhibition as an Indicator of Immunologically Mediated Target Cell Injury in. *Infection and Immunity*, 20(1), 242–247.

- Kelly, P. J. (2000). Canine ehrlichioses: an update. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(2), 77–86.
- Kittleson, M. (1998). Primary myocardial disease leading to chronic myocardial failure (dilated cardiomyopathy and related diseases). In *Small Animal Cardiovascular Medicine* (1st ed., pp. 319–346). Philadelphia: Mosby.
- Kledmanee, K., Suwanpakdee, S., Krajangwong, S., Chatsiriwech, J., Suksai, P., Suwannachat, P., ... Chaichoun, K. (2009). Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of Ehrlichia canis, Babesia spp and Hepatozoon canis in canine blood. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.*, 40(1), 35–39.
- Koh, Y., Koo, J., Biswas, A., & Kobayashi, K. S. (2010). MyD88-Dependent Signaling Contributes to Host Defense against Ehrlichial Infection. *PLoS One*, 5(7), 1–11.
- Kommenou, A. a., Mylonakis, M. E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., ... Ofri, R. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): A retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 137–142.
- Kongklieng, A., Thanchomnang, T., Intapan, P., Boonmars, T., Janwan, P., Sanpool, O., ... Maleewong, W. (2014). Detection of Ehrlichia canis in canine blood samples by real-time fluorescence resonance energy transfer (FRET) PCR and melting curve analysis. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.*, 45(5), 1149–1156.
- Krupka, I., & Straubinger, R. K. (2010). Lyme Borreliosis in Dogs and Cats: Background, Diagnosis, Treatment and Prevention of Infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(6), 1103–1119.
- Kuehn, N., & Gaunt, S. (1985). Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(4), 355–358.

- Kumagai, Y., Matsuo, J., Hayakawa, Y., & Rikihisa, Y. (2010). Cyclic di-GMP Signaling Regulates Invasion by *Ehrlichia chaffeensis* of. *Journal of Bacteriology*, 192(16), 4122–4133.
- Leiva, M., Naranjo, C., & Peña, M. T. (2005). Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Veterinary Ophthalmology*, 8(6), 387–393.
- Levenhagen, M. A., Alves, R. N., Rieck, S. E., Labruna, M. B., & Beletti, M. E. (2012). The role of cytoskeleton , components of inositol phospholipid signaling pathway and iron in *Ehrlichia canis* in vitro proliferation. *Veterinary Research Communications*, 36(3), 195–199.
- Lin, M., & Rikihisa, Y. (2004). *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2 / 4 , CD14 and transcription factors PU . 1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF- k B , ERK 1 / 2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cellular Microbiology*, 6, 175–186.
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. In R. Hnasko (Ed.), *ELISA Methods and Protocols* (pp. 51–61). Springer.
- Lina, T. T., Farris, T., Luo, T., Mitra, S., Zhu, B., & McBride, J. W. (2016). Hacker within! *Ehrlichia chaffeensis* Effector Driven Phagocyte Reprogramming Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6 (May), 1–17.
- Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 40(6), 1121–1140.
- Liu, H., Bao, W., Lin, M., Niu, H., & Rikihisa, Y. (2013). *Ehrlichia* type IV secretion effector ECH0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD. *Cellular Microbiology*, 14(7), 1037–1050.
- López, J., Abarca, K., Mundaca, M. I., & Caballero, C. (2012). Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile Javier. *Zoonosis*, 29(5), 527–530.

- Lopez, J., Castillo, A., Muñoz, M., & Hildebrandt, S. (1999). Hallazgo de Ehrlichia canis en Chile, informe preliminar. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 31(2).
- López, L., Venteo, A., Aguirre, E., Garci, M., Rodriguez, J., Inmaculada Amusátegui, ... Rueda, P. (2007). Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against Ehrlichia canis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 642, 635–642.
- Lovering, S., Pierce, K., & Adams, L. (1980). Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res*, 41, 1266–1271.
- Luckschander, N., Kleiter, M., & Willmann, M. (2003). Renal amyloidosis caused by Ehrlichia canis. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 145(10), 482–485.
- Maekawa, N., Konnai, S., Balbin, M. M., Mingala, C. N., Gicana, K. R. B., Bernando, F. A. E. M., ... Ohashi, K. (2017). Ticks and Tick-borne Diseases Molecular detection and phylogenetic analysis of Ehrlichia canis in a Philippine dog. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(2), 266–269.
- Makino, H., Franco, V., Fujumori, M., Yuki, J., Lima, A., Luciano, V., & Parto, A. (2015). Ehrlichia canis detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. *Ciência Rural*, 46(2), 1–5.
- Manna, L., Alberti, A., Pavone, L. M., Scibelli, A., Staiano, N., & Gravino, A. E. (2004). First molecular characterization of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a dog in South Italy. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 167(3), 224–227.
- Martin, C. (1999). Ocular Manifestations of systemic disease. *Veterinary Ophthalmology*, 1401–1447.
- Massa, K. L., Gilger, B. C., Miller, T. L., & Davidson, M. G. (2002). Causes of uveitis in dogs: 102

- cases (1989-2000). *Veterinary Ophthalmology*, 5(2), 93–98.
- Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., ... Kyrpidis, N. C. (2006). The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies †. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4015–4023.
- Mcbride, J. W., Corstvet, R. E., Gaunt, S. D., Boudreaux, C., Guedry, T., & Walker, D. H. (2003). Kinetics of Antibody Response to *Ehrlichia canis* Immunoreactive Proteins. *Infection and Immunity*, 71(5), 2516–2524.
- McBride, J., & Walker, D. (2011). Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Rev Mol Med*, 13(e3).
- Mccown, M. E., Monterroso, V. H., & Cardona, W. (2015). Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* , and *Dirofilaria immitis* in Dogs From Three Cities in Colombia. *Revista CES*, 10(2), 224–231.
- Millichamp, N., & Dziezyc, J. (1991). Mediators of ocular inflammation. *Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology.*, 1(1), 41–58.
- Moonarmart, W., Sungpradit, S., Rawangchue, T., Suphaphiphat, K., Suksusieng, S., & Jirapattharasate, C. (2014). Clinical history and hematological findings among canines with monocytic ehrlichiosis. *Sudeste Asiático J Trop Med Salud Pública*, 45(1), 157–166.
- Moore, R. M., Muir, W. W., & Granger, D. N. (1995). Mechanisms of Gastrointestinal Ischemia - Reperfusion Injury and Potential Therapeutic Interventions : A Review and Its Implications in the Horse Pathogenesis of Ischemia Production of Oxygen-Derived Free Radicals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9(3), 115–132.
- Moreira, S. M., & Passos, L. F. (2005). Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of

- experimentally infected dogs Detecção de Ehrlichia canis em aspirados de medula óssea de cães experimentalmente infectados. *Ciência Rural*, 35(4), 958–960.
- Moumène, A., & Meyer, D. F. (2016). Ehrlichia 's molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes and Infection*, 18, 172–179.
- Movilla, R., Altet, L., Serrano, L., Tabar, M., & 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.
- Mubayi, A., Paredes, M., & Ospina, J. (2018). A Comparative Assessment of Epidemiologically Different Cutaneous Leishmaniasis Outbreaks in Madrid, Spain and Tolima, Colombia: An Estimation of the Reproduction Number via a Mathematical Model. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(2), 43.
- Munhoz, T. D., Faria, J. L., Vargas-Hernández, G., Fagliari, J. J., Santana, Á. E., Machado, ; Rosângela Zacarias, & Tinucci-Costa, M. (2012). Experimental Ehrlichia canis infection changes acute-phase proteins. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(3), 206–212.
- Muñoz, J., Ramírez, G. F., & Garcés, L. F. (2015). Consulta externa en clínicas veterinarias de Manizales. Análisis epidemiológico en Caninos. *Spei Domus*, 11(23), 18–23.
- Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Billinis, C., & Leontides, L. S. (2003). Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis ( Ehrlichia canis ): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 91, 197–204.
- Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., & Leontides, L. S. (2006). Bone marrow mastocytosis in dogs with myelosuppressive monocytic ehrlichiosis ( Ehrlichia canis ): a retrospective study. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(3), 311–314.

- Mylonakis, M. E., Kritsepi-Konstantinou, M., Dumles, J. S., Diniz, P. P. V. P., Day, M. J., Siarkou, V. I., ... Koutinas, A. F. (2010). Severe Hepatitis Associated with Acute Ehrlichia canis Infection in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 633–638.
- Mylonakis, M. E., Siarkou, V. I., & Koutinas, A. F. (2010). Myelosuppressive Canine Monocytic Ehrlichiosis ( Ehrlichia Canis ): An Update On The Pathogenesis , Diagnosis And Management. *Journal of Israel Veterinary Medical Association*, 65(4), 129–135.
- Mylonakis, M., Koutinas, A., Breitschwerdt, E., Hegarty, B., Billinis, C., Leontides, L., & Kontos, V. (2004). Chronic canine ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a retrospective study of 19 natural cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc*, 40, 174–184.
- Mylonakis, M., & Theodorou, K. (2017). Canine monocytic ehrlichiosis : an update on diagnosis and treatment. *Acta Veterinaria-Beograd*, 67(3), 299–317.
- Nair, A. D. S., Cheng, C., Ganta, C. K., Sanderson, M. W., Alleman, R., Munderloh, U. G., & Ganta, R. R. (2016). Comparative Experimental Infection Study in Dogs with Ehrlichia canis , E . chaffeensis , Anaplasma platys and A . phagocytophilum. *PLoS One*, 11(2), 1–21.
- Nambooppha, B., Rittipornlertrak, A., & Tattiyapong, M. (2018). Infection , Genetics and Evolution Two di ff erent genogroups of Ehrlichia canis from dogs in Thailand using immunodominant protein genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 63(May), 116–125.
- Nazari, M., Lim, S. Y., Watanabe, M., Sharma, R. S. K., Cheng, N. A. B. Y., & Watanabe, M. (2013). Molecular Detection of Ehrlichia canis in Dogs in Malaysia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), 7–10.
- Niyindo, M., Huxsoll, D., Ristic, M., Kakoma, I., Marron, J., Carson, C., & Stephenson, E. (1980). Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with Ehrlichia canis. *Am J Vet Res*, 250–254.



- Nyindo, M., Huxsoll, D., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J., Carson, C., & Stephenson, E. (1980). Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal Veterinary Research*, *41*(2), 250–254.
- Ohashi, N., Unver, A., Zhi, N., & Rikihisa, Y. (1998). Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia canis* and Application of the Recombinant Protein for Serodiagnosis. *American Society for Microbiology*, *36*(9), 2671–2680.
- Ohashi, N., Zhi, N., Lin, Q., & Rikihisa, Y. (2002). Characterization and Transcriptional Analysis of Gene Clusters for a Type IV Secretion Machinery in Human Granulocytic and Monocytic Ehrlichiosis Agents. *Infection and Immunity*, *70*(4), 2128–2138.
- Ohta, K., Yamagami, S., Wiggert, B., Dana, M. R., & Streilein, J. W. (2002). Chemokine gene expression in iris-ciliary body during experimental autoimmune uveoretinitis. *Current Eye Research*, *24*(6), 451–457.
- Oriá, A., Dórea Neto, F., Machado, R., Santana, A., Guerra, J., da Silva, V., & Laus, J. L. (2008). Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. *R. Bras. Ci. Vet.*, 94–97.
- Oriá, A. P., Pereira, P. M., & Laus, J. L. (2004). Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Ciência Rural*, *34*(4), 1289–1295.
- Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P. M., Chidlow, G., & Graham, M. (2004). Retinal ischemia : mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, *23*(1), 91–147.
- Özata, F., & Ural, K. (2014). Thrombocyte indices in dogs infected with *Ehrlichia canis* and

- Anaplasma phagocytophilum. *MVZ Córdoba*, 19(3), 4277–4288.
- Pancier, R. J., Ewing, S. a, & Confer, a W. (2001). Ocular histopathology of Ehrlichial infections in the dog. *Veterinary Pathology*, 38(1), 43–46.
- Pardo, R. H., Cabrera, O. L., Becerra, J., Fuya, P., & Ferro, C. (2006). Lutzomyia longiflocosa , posible vector en un foco de leishmaniasis cutánea en la región subandina del departamento del Tolima , Colombia ,. *Biomédica*, 26(1), 95–108.
- Parmar, C., Pednekar, R., Jayraw, A., & Gatne, M. (2013). Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 1201(12), 282–290.
- Paternina, L., Diaz, Y., Paternina Gómez, M., & Bejarano, E. . (2009). Canis familiaris un nuevo hospedero de Ornithodoros (A.) puertoricensis Fox, 1947 (Acari: Ixodida) en Colombia. *Acta Biol. Colomb.*, 14(1) 154–160.
- Peda, A., Betance, L., Soto, E., Fraites, T., & Verma, A. (2014). Dermatophytosis in a Dog Seropositive for Ehrlichia Spp. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 2(2), 21–23.
- Peña, M. T., Naranjo, C., Klauss, G., Fondevila, D., Leiva, M., Roura, X., ... Dubielzig, R. R. (2008). Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog. *Journal of Comparative Pathology*, 138, 32–39.
- Pierangeli, J., Pascoti, R., Maciel, M., Hirsch, C., Barcelos, C., Guedes, E., & Guimarães, A. M. (2017). Ehrlichia canis. *Ciência Animal Brasileira*, 18, 1–9.
- Pierce, K., Marrs, G., & Hightower, D. (1977). Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *American Journal Veterinary Research*, 38(11), 1821–1825.
- Pinhanelli, V. C., Costa, P. N. M., Silva, G., Aguiar, D. M., & Silva, C. M. L. (2015). Development

- and evaluation of a loop- mediated isothermal amplification assay for detection of Ehrlichia canis DNA in naturally infected dogs using the p30 gene. *The Original Genetics and Molecular Research*, 74(4), 17885–17892.
- Reine, N. J. (2004). Infection and blood transfusion: A guide to donor screening. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 19(2), 68–74.
- Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 286–308.
- Rikihisa, Y., Lin, M., Niu, H., & Cheng, Z. (2009). Type IV Secretion System of Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis. In *Rickettsiology And Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*, 1166,106–111.
- Romero, L. E., Meneses, A. I., Salazar, L., Jiménez, M., Romero, J. J., Aguiar, D. M., ... Dolz, G. (2011). First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Costa Rica , Central America. *Research in Veterinary Science*, 91(1), 95–97.
- Romero, M. H., López, M., Echeverry, M. C., & Rivas, F. A. (2008). Leishmaniasis Visceral Canina: Pruebas Diagnósticas no identifican Estados Reales de la Infección. *Revista de Salud Pública*, 10(2), 290–298.
- Roy, S. S., Misra, S. S., & Willayat, M. M. (2013). Isolation and identification of bacteria of public health importance from mobile phones of fish and animal handlers of Kashmir, India. *African Journal of Microbiology Research*, 7(21), 2601–2607.
- Roze, M. (2002). Ocular Manifestations of Canine Leishmaniasis. Diagnosis and Treatment. In *WSAVA* (pp. 1–4).
- Ruiz, A., & Lopez, A. (2016). *Evaluación de la presencia de Ehrlichia canis en caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria en la ciudad de ibagué mediante la técnica*

de pcr. Universidad de La Salle.

- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-peña, A., Kohn, B., & Harrus, S. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(75), 1–20.
- Salazar, H., Buriticá, E., Echeverry, D., & Barbosa, I. (2014). Seroprevalencia de Ehrlichia canis y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 7(1), 56–63.
- Shelah-Goraly, M., Aroch, I., Kass, P. H., Bruchim, Y., & Ofri, R. (2009). A prospective study of the association of anemia and thrombocytopenia with ocular lesions in dogs. *Veterinary Journal*, 182(2), 187–192.
- Shipov, a., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T., & Harrus, S. (2008). Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 153(1–2), 131–138.
- Siarkou, V. I., Mylonakis, M. E., Bourtzi-hatzopoulou, E., & Koutinas, A. F. (2007). Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of Ehrlichia canis strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*, 125, 304–312.
- Silva-molano, R. F., Sánchez-ucrós, N., & Loaiza-echeverri, A. M. (2008). Reporte de presentación de Ehrlichia canis en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. *Veterinaria y Zootecnia*, 2(1), 27–31.
- Silva, L. S., Pinho, F. A., Prianti, M. G., Braga, J. F. V, Pires, L. V, França, S. A., & Silva, S. M. M. S. (2016). Renal histopathological changes in dogs naturally infected with Ehrlichia canis. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 9(1), 2–15.
- Smith, R. D., Ristic, M., Huxsoll, D. L., & Baylor, R. A. (1975). Platelet Kinetics in Canine

- Ehrlichiosis: Evidence for Increased Platelet Destruction as the Cause of Thrombocytopenia. *Infection and Immunity*, 11(6), 1216–1221.
- Stiles, J. (2000). Canine Rickettsial Infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 30(5), 1135–1149.
- Stiles, J. (2011). Ocular Infection. In *Infectious diseases of dog and cat* (4<sup>o</sup>, p. 1071).
- Straubinger, R. K., Summers, B. A., Chang, Y. F., & Appel, M. J. G. (1997). Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(1), 111–116.
- Swanson, J. F. (1990). Ocular Manifestations of Systemic Recent Developments. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20(3), 849–867.
- Tajima, T., & Rikihisa, Y. (2005). Cytokine Responses in Dogs Infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma Strain. *New York Academy of Sciences*, 1063(1), 429–432.
- Tajima, T., & Wada, M. (2013). Veterinary Immunology and Immunopathology Inhibitory effect of interferon gamma on frequency of *Ehrlichia canis* -infected cells in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156(3–4), 200–204.
- Tal, A., & Shannahan, D. (1995). Ehrlichiosis Presenting as a Life-Threatening Illness. *The American Journal of Medicine*, 98, 318–319.
- Thomas, S., Popov, V. L., & Walker, D. H. (2010). Exit Mechanisms of the Intracellular Bacterium *Ehrlichia*. *PLoS One*, 5(12), 1–12.
- Thomson, K., Yaaran, T., Belshaw, A., Curson, L., Tisi, L., Maurice, S., & Kiddle, G. (2018). A new TaqMan method for the reliable diagnosis of *Ehrlichia* spp . in canine whole blood. *Parasites & Vectors*, 11(350), 1–7.

- Triviño, A., Rueda, A., Diaz, D., Mesa, N. C., Benavides, J. A., Imbachi, K., ... López, R. (2013). Identificación de Ehrlichia canis ( Donatien & Lestoquard ). *Veterinaria y Zootecnia*, 7(1), 37–48.
- Unver, A., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2006). Cytokine Gene Expression by Peripheral Blood Leukocytes in Dogs Experimentally Infected with a New Virulent Strain of Ehrlichia canis. *New York Academy of Sciences*, 486(1), 482–486.
- Van Der Woerdt, A., & Acvo, D. (2001). Management of Intraocular Inflammatory Disease. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 16(1), 58–61.
- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012a). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 254–260.
- Vargas-Hernandez, G., André, M. R., Munhoz, T. D., Faria, J. M. L., MacHado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012b). Molecular characterization of Hepatozoon canis in dogs from Colombia. *Parasitology Research*, 110(1), 489–492.
- Veloso, J. F., Sauer, L., Oriá, Arianne Pontes Deusdete, G., Santos, A. C., Oliveira, C. F., de Andrade, T. N., & Santiago, R. (2018). Molecular diagnosis of Ehrlichia canis infection in dogs with uveitis Diagnóstico molecular da infecção por Ehrlichia canis em cães com uveíte. *Ciências Agrárias*, 39(3), 1049–1056.
- Vinasco, J., Li, O., Alvarado, A., Diaz, D., Tabachi, L., Sirigireddy, K., ... Moro, M. H. (2007). Molecular Evidence of a New Strain of Ehrlichia canis from South America Molecular Evidence of a New Strain of Ehrlichia canis from South America. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2716-2719.

- Wakeel, A., Dulk-ras, A. Den, Hooykaas, P. J. J., & McBride, J. W. (2011). Ehrlichia chaffeensis tandem repeat proteins and Ank200 are type 1 secretion system substrates related to the repeats-in-toxin exoprotein family. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1(December), 1–19.
- Walser-Reinhardt, L., Schaarschmidt-Kiener, D., Forster, J.-L., Matheis, F., & Spiess, B. (2012). Direct detection of Ehrlichia canis by PCR in the conjunctiva of a dog with bilateral anterior uveitis Case history. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 154(4), 149–152.
- Waner, T., Harrus, S., & Bogin, E. (1997). Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69, 307–317.
- Waner, T., Harrus, S., Weiss, D., Bark, H., & Keysary, A. (1995). Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immun. Immunopath*, 48, 177–182.
- Wasik, B., & Adkins, E. (2010). Canine Anterior Uveitis. *Compendium-Continuing Education for Veterinarians*, E1–E11.
- Wiggans, K. T., Vernau, W., Lappin, M. R., Thomasy, S. M., & Maggs, D. J. (2013). Diagnostic utility of aqueocentesis and aqueous humor analysis in dogs and cats with anterior uveitis. *Veterinary Ophthalmology*, 17(3), 1–9.
- Woldehiwet, & Ristic, M. (1993). Canine ehrlichiosis. *Pergamon Press*, 169–186.
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of Anaplasma phagocytophilum. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), 108–122.
- Wong, S. S. Y., Teng, J. L. L., Poon, R. W. S., Choi, G. K. Y., Chan, K.-H., Yeung, M. L., ... Yuen, K.-Y. (2011). Comparative Evaluation of a Point-of-Care Immunochromatographic Test SNAP 4Dx with Molecular Detection Tests for Vector-Borne Canine Pathogens in Hong

- Kong. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(9), 1269–1277.
- Woody, B., & Hoskins, J. (1991). Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. North Am*, 21, 75–98.
- Xing-Li, X., Tian-yin, C., Hu, Y., & Fen, Y. (2015). Identification of intestinal bacterial flora in *Rhipicephalus microplus* ticks by conventional methods and PCR– DGGE analysis. *Springer International Publishing Switzerland*, 1–12.
- Xiong, Q., Bao, W., Ge, Y., & Rikihisa, Y. (2008). Ehrlichia ewingii Infection Delays Spontaneous Neutrophil Apoptosis through Stabilization of Mitochondria. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1110–1118.
- Yang, Q., Stevenson, H. L., Scott, M. J., & Ismail, N. (2015). Type I Interferon Contributes to Noncanonical Inflammasome Activation, Mediates Immunopathology, and Impairs Protective Immunity during Fatal Infection with Lipopolysaccharide-Negative Ehrlichiae. *The American Journal of Pathology*, 185(2), 446–461.
- Yokota, H., Narayanan, S. P., Zhang, W., Liu, H., Rojas, M., Xu, Z., ... Caldwell, R. B. (2011). Neuroprotection from Retinal Ischemia / Reperfusion Injury by NOX2 NADPH Oxidase Deletion. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(11), 8123–8131.
- Zhang, J., Popov, V. L., Gao, S., Walker, D. H., & Yu, X. (2007). The developmental cycle of Ehrlichia chaffeensis in vertebrate cells. *Cellular Microbiology*, 9, 610–618.
- Zhang, J., & Wang, J. (2018). Complete Genome Sequence of Ehrlichia canis Strain YZ-1, Isolated from a Beagle with Fever and Thrombocytopenia. *Genome Announcements*, 6(9), 1–2.
- Zhang, X., Luo, T., Keysary, A., Baneth, G., Miyashiro, S., Strenger, C., ... McBride, J. W. (2008). Genetic and Antigenic Diversities of Major Immunoreactive Proteins in Globally Distributed Ehrlichia canis Strains. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(7), 1080–1088.



Zheng, W., Liu, M., Franck, P., Moumouni, A., Liu, X., Efstratiou, A., ... Chen, H. (2017). First molecular detection of tick-borne pathogens in dogs from Jiangxi , China. *The Journal Veterinary Medical Science*, 79(2), 248–254.

Zweygarth, E., Cabezas-cruz, A., Josemans, A. I., Oosthuizen, M. C., Matjila, P. T., Lis, K., ... Passos, L. M. F. (2014). In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant Ehrlichia canis isolates. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), 1–9.

## 7. ANEXOS

## Anexo 1. Formato examen oftalmológico

## EXAMEN OFTALMOLÓGICO

DATOS DEL PACIENTE	DATOS DEL PROPIETARIO
Nombre:	Nombre:
Especie:	Dirección:
Raza	Teléfono:
Sexo:	Cel:
Edad:	E-mail:

## Ojo derecho

Reflejo de amenaza (+) (-)

Reflejo pupilar directo: rápido ( ) medio ( ) ausente ( )  
Indirecto: rápido ( ) medio ( ) ausente ( )

Schlimer: \_\_\_\_\_ mm/min

PIO: \_\_\_\_\_ mmHg

## Globo ocular

Normal ( ) Exoftalmia ( ) Enoftalmia ( ) Buphalmia ( )  
Microftalmia ( ) otros \_\_\_\_\_

## Párpados

Triquisis ( )

Distiquiasis ( )

Ectropión ( )

Entropión ( )

Otros \_\_\_\_\_



## Conjuntiva

Hiperemia ( ) Folículos ( ) Quemosis ( )

Prolapso de la glándula del tercer párpado ( )

Otros \_\_\_\_\_

## Aparato lacrimal

## Ojo izquierdo

Reflejo de amenaza (+) (-)

Reflejo pupilar directo: rápido ( ) medio ( ) ausente ( )  
Indirecto: rápido ( ) medio ( ) ausente ( )

Schlimer: \_\_\_\_\_ mm/min

PIO: \_\_\_\_\_ mmHg

## Globo ocular

Normal ( ) Exoftalmia ( ) Enoftalmia ( ) Buphalmia ( )  
Microftalmia ( ) otros \_\_\_\_\_

## Párpados

Triquisis ( )

Distiquiasis ( )

Ectropión ( )

Entropión ( )

Otros \_\_\_\_\_



## Conjuntiva

Hiperemia ( ) Folículos ( ) Quemosis ( )


Prolapso de la glándula del tercer párpado ( )

Otros \_\_\_\_\_

## Aparato lacrimal

**Córnea**


Ulcera ( )  
 Edema ( )  
 Vascularización ( )  
 Pigmentación ( )  
 Degeneración ( )  
 Distrofia ( )  
 Otros \_\_\_\_\_



Fluoresceína (+) (-)  
 Rosa de Bengala (+) (-)

**Córnea**

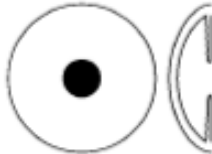
Ulcera ( )  
 Edema ( )  
 Vascularización ( )  
 Pigmentación ( )  
 Degeneración ( )  
 Distrofia ( )  
 Otros \_\_\_\_\_



Fluoresceína (+) (-)  
 Rosa de Bengala (+) (-)

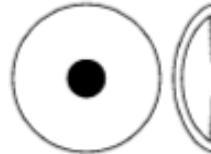
**Cámara anterior**

Hifema ( )  
 Hipoplón ( )  
 Llamarada acuosa ( )




**Cámara anterior**

Hifema ( )  
 Hipoplón ( )  
 Llamarada acuosa ( )



**Iris y pupila**


Sinequia: anterior ( ) posterior ( )  
 Iris bombé ( ) Atrofia ( ) Midriasis ( ) Miosis ( )  
 Rubeosis ( ) Heterocromía ( ) Iridodonesis ( )



Otros \_\_\_\_\_

**Iris y pupila**


Sinequia: anterior ( ) posterior ( )  
 Iris bombé ( ) Atrofia ( ) Midriasis ( ) Miosis ( )  
 Rubeosis ( ) Heterocromía ( ) Iridodonesis ( )



Otros \_\_\_\_\_

**Lente**


Esclerosis ( )  
 Catarata: Madura ( ) Inmadura ( ) Capsular ( )  
 Subluxación ( ) luxación ( )



Otros \_\_\_\_\_

**Lente**

Esclerosis ( )  
 Catarata: Madura ( ) Inmadura ( ) Capsular ( )  
 Subluxación ( ) luxación ( )



Otros \_\_\_\_\_

**Fondo y vitreo**

Ausencia de vasos ( ) hiperreflexia ( )

hiporreflexia ( ) Hemorragias ( )

Dresprendimiento ( ) Vasos tortuosos ( )

edema de papila ( )

Otros \_\_\_\_\_



**Fondo y vitreo**

Ausencia de vasos ( ) hiperreflexia ( )

hiporreflexia ( ) Hemorragias ( )

Dresprendimiento ( ) Vasos tortuosos ( )

edema de papila ( )

Otros \_\_\_\_\_



Observaciones :

---



---



---



---