

## EVALUACIÓN DEL EXAMEN HEMATOLÓGICO EN EL DIAGNÓSTICO DE EHRLICHIOSIS CANINA

### EVALUATION OF THE HEMATOLOGY TEST IN THE DIAGNOSIS OF CANINE EHRLICHIOSIS

Luis Hoyos S.<sup>1</sup>, Olga Li E.<sup>1</sup>, Arnaldo Alvarado S.<sup>1</sup>, Francisco Suárez A.<sup>2</sup> y Diego Díaz C.<sup>3</sup>

#### RESUMEN

Se determinó el grado de concordancia entre el examen hematológico y la prueba de ELISA directa en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. Se emplearon 77 muestras de sangre de perros con signos clínicos compatibles a ehrlichiosis canina y 20 controles clínicamente normales que fueron obtenidos en la Clínica de Animales Menores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se encontró un  $84.7 \pm 11.0\%$  de grado de concordancia mediante la prueba de Kappa. Así mismo, se determinó que la trombocitopenia, leucopenia, anemia y el antecedente de contacto con garrapatas tuvieron una relación significativa con la presencia de la enfermedad ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el examen hematológico es muy importante en el diagnóstico de la ehrlichiosis canina y que el ELISA directo es una excelente prueba confirmatoria.

**Palabras clave:** *Ehrlichia canis*, examen hematológico, trombocitopenia, prueba directa de ELISA

#### ABSTRACT

The present study evaluated the level of agreement between the hematology test and the direct ELISA assay for the diagnosis of canine ehrlichiosis. It was used 77 samples from dogs with clinical signs compatible with canine ehrlichiosis and 20 control samples from the Hospital of Small Animals of the Veterinary Medicine Faculty, San Marcos National University. The results showed  $84.7 \pm 11.0\%$  of concordance by the Kappa test. Likewise, the thrombocytopenia, leukopenia, anemia and history of tick infestation were significantly related ( $p < 0.05$ ) to clinical evidence of the disease. The results revealed that the hematology test was important in the diagnosis of canine ehrlichiosis and that the direct ELISA was an excellent confirmatory test.

**Key words:** *Ehrlichia canis*, hematology, thrombocytopenia, direct ELISA assay

<sup>1</sup> Laboratorio de Patología Clínica, <sup>2</sup>Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, <sup>3</sup>Clínica de Animales Menores, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

<sup>4</sup>E-mail: olgalie@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad rickettsial causada por microorganismos del género *Ehrlichia* sp., teniendo como principal agente a *Ehrlichia canis*, microorganismo gram negativo, intracelular obligatorio, cocoide o pleomórfico, el cual tiene como células blanco a monocitos, macrófagos y linfocitos. En sangre periférica se observan en agrupaciones bacterianas intracitoplasmáticas denominadas “formas densas” (0.2-0.4 mm) y “formas ligeras” (0.8-1.5 mm), siendo éstas últimas asociadas a cepas de mayor patogenicidad. Esta bacteria es transmitida por el *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata parda del perro, cuyo mayor impacto se presenta en épocas calurosas (primavera y verano) (Harrus *et al.*, 1999).

Desde su detección en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935, *E. canis* se ha distribuido a nivel mundial incluyendo a los países sudamericanos (Pérez *et al.*, 1996; López *et al.*, 1999; Aguirre *et al.*, 2004; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). En estos últimos años, se encontró una seroprevalencia del 16.5% para *E. canis* en tres distritos de Lima (Adrianzén, 2002).

La hematología representa una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico de la ehrlichiosis canina, debido a que la bacteria y las alteraciones más importantes de la enfermedad se evidencian a nivel sanguíneo (Ettinger, 1992; Greene, 1997). Recientemente, se han diseñado pruebas serológicas rápidas para la detección de anticuerpos de diversos microorganismos rickettsiales, entre ellos *E. canis*, las cuales son de fácil realización y adecuadas para uso clínico (IDEXX Laboratorios, 2002). El avance en la investigación ha contribuido a mejorar las técnicas diagnósticas para esta enfermedad, detectándose secuencias específicas del gen ADN ribosómico 16S del microorganismo causal, mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa anidada (*Nested PCR*) (Pérez *et al.*, 1996; Breitschwerdt *et al.*,

1998; Kordick *et al.*, 1999; Unver *et al.*, 2001) y RT-PCR (Yu *et al.*, 2000; Unver *et al.*, 2003). El inconveniente para la realización de estas pruebas con fines diagnósticos es el económico, aunque es plenamente justificable con fines de investigación (Greene, 1997).

La distribución de los microorganismos de la Familia Anaplasmataceae (*Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. y *Neorickettsia* sp.) en el país es aún desconocida; de allí que el presente estudio tuvo por objetivo hallar el grado de concordancia (estadístico de *Kappa*) entre la hematología y la técnica de ELISA directa (detección de anticuerpos contra *E. canis*) en el diagnóstico de Ehrlichiosis canina, para conocer si la hematología es útil para detectar la enfermedad, debido a su bajo costo; así mismo determinar si los perros con ehrlichiosis en la zona bajo estudio evidencian anticuerpos contra *E. canis* (o especies del género *Ehrlichia* sp.), u otros géneros, tales como el Anaplasma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM). Se utilizaron 97 perros (77 con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis canina y 20 aparentemente normales), provenientes de la Clínica de Animales Menores de la FMV-UNMSM. Los 20 animales del grupo control fueron utilizados como grupo referencial para los parámetros sanguíneos normales en los caninos, adicional a los rangos referenciales establecidos para la especie (Benjamín, 1991).

Se elaboró una ficha clínica para cada animal, indicando los datos generales (sexo, edad, raza), así como el antecedente de garrapatas y la evaluación clínica completa. Se colectaron de 2 ml de sangre de la vena cefálica en frascos con EDTA para la realización del examen hematológico completo,

seguida de la detección de anticuerpos contra *E. canis* mediante la prueba de ELISA directo. Las muestras fueron colectadas y procesadas entre enero del 2002 y noviembre del 2004. Los perros considerados con ehrlichiosis canina debían presentar signos clínicos inespecíficos (depresión, fiebre, anorexia, pérdida de peso, esplenomegalia y linfadenopatía) y específicos (epistaxis, petequias, equimosis, eritema, hifema y hematuria).

En el examen hematológico, las muestras se procesaron siguiendo los protocolos de Benjamín (1991), comparando los resultados con los rangos referenciales de la serie eritrocítica ( $5.0-8.0 \times 10^6/\mu\text{l}$ ), serie leucocítica ( $9.0-12.0 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) y serie trombocítica ( $200-400 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) para caninos. Los animales considerados como positivos al examen hematológico debían presentar trombocitopenia, pudiendo estar asociada con anemia o leucopenia. Los animales considerados como negativos no debían manifestar trombocitopenia (pudiendo encontrarse sólo anemia o leucopenia). En las muestras de sangre se evaluó la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas (formas densas y ligeras) en leucocitos, compatibles con bacterias del género *Ehrlichia*. Para la detección serológica de anticuerpos contra *E. canis* se utilizó una prueba comercial, basada en la técnica direc-

ta de ELISA (Snap 3DX de Laboratorios @IDEXX). Esta prueba cualitativa utilizó un conjugado específico para caninos y sangre con anticoagulante (EDTA) o suero sanguíneo (IDEXX Laboratories, 2002).

Los datos obtenidos fueron utilizados para hallar el grado de concordancia entre el examen hematológico y la técnica de ELISA directa, mediante el análisis estadístico de *Kappa*. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para determinar la existencia de diferencia significativa entre las variables sexo, edad, raza, presencia de trombocitopenia, leucopenia y anemia, y antecedente de garrapatas en relación a la presencia de la enfermedad. Además, se determinó la probable asociación entre la raza Pastor Alemán y razas nórdicas (Samoyedo y Siberiano) con la evidencia de sangrados. Finalmente, se determinaron las frecuencias de citopenias y signos clínicos hallados en los animales positivos y negativos a la prueba serológica.

## RESULTADOS

El grado de concordancia entre el examen hematológico y la técnica indirecta de ELISA fue de  $84.7 \pm 11.0\%$ , con un intervalo de confianza del 95%.

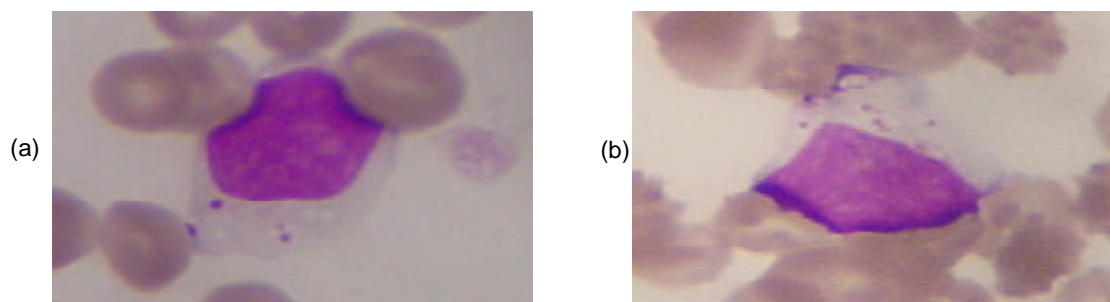


Figura 1. Sangre periférica. Linfocitos infectados con (a) tres “formas densas” y (b) múltiples “formas densas” de *Ehrlichia canis* (x1600)

Cuadro 1. Distribución de 77 muestras seropositivas a *Ehrlichia canis* en caninos según el sexo, edad, raza, trombocitopenia, leucopenia, anemia y antecedente de garrapatas (2002 -2004)

Variables		Muestreados (n)	Perros positivos		IC <sup>1</sup>
			n	%	
Sexo	Macho	59	43	72.9 <sup>a</sup>	11.3
	Hembra	18	15	83.3 <sup>a</sup>	17.2
Edad	< 2 años	20	13	65.0 <sup>2</sup>	20.9
	2 - 4 años	31	25	80.6 <sup>a</sup>	13.9
	> 4 años	26	20	76.9 <sup>a</sup>	16.2
Raza	Pastor Alemán	15	13	86.7 <sup>a</sup>	17.2
	Otras Razas	62	45	72.6 <sup>a</sup>	11.1
Trombocitopenia	No	14	1	7.1 <sup>a</sup>	13.5
	Sí	63	57	90.5 <sup>b</sup>	7.3
Leucopenia	No	32	18	56.3 <sup>a</sup>	17.2
	Sí	45	40	88.9 <sup>b</sup>	9.2
Anemia	No	10	3	30.0 <sup>a</sup>	28.4
	Sí	67	55	82.1 <sup>b</sup>	9.2
Antecedente de Garrapatas	No	55	38 <sup>a</sup>	69.1	12.2
	Sí	22	20 <sup>b</sup>	90.9	12.0

<sup>1</sup> Intervalo de confianza del 95%

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de variables indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

La distribución numérica y porcentual de las muestras seropositivas en base a las variables bajo evaluación se muestra en el Cuadro 1.

Las 13 muestras seropositivas a *Ehrlichia canis* de perros Pastor Alemán (raza susceptible) tuvieron signos hemorrágicos en el  $65.5 \pm 26.5\%$  de los casos en relación al  $48.9 \pm 14.6\%$  en 45 muestras de otras razas. Por otro lado, las 6 muestras seropositivas (100%) de perros de razas nórdicas (Siberian-Husky y Samoyedo) mostraron signos hemorrágicos en comparación al 46.2% en 52 muestras de otras razas.

La frecuencia de los signos clínicos encontrados en los animales evaluados es presentada en el Cuadro 3, donde resaltan los signos hemorrágicos característicos de la ehrlichiosis canina.

## DISCUSIÓN

El grado de concordancia encontrado en el presente estudio entre el examen hematológico y la técnica directa de ELISA ( $84.7 \pm 11.0\%$ ), es considerado como muy bueno. Este alto grado de concordancia indica que en el medio, el examen hematológico es de gran utilidad para el diagnóstico de ehrlichiosis canina. Aunque la inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) es considerada la prueba "Estándar de Oro" para la ehrlichiosis (Ettinger, 1992), la técnica de ELISA directa utilizada en el presente estudio, constituye una excelente prueba para el diagnóstico confirmatorio de ehrlichiosis canina causada por especies del género *Ehrlichia* sp. (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). Se sabe que este género posee un gru-

Cuadro 2. Frecuencias de citopenias en 77 muestras seropositivas a *Ehrlichia canis* en caninos, como resultado de la prueba de ELISA directa (2002-2004)

Citopenia	Positivo			Negativo		
	n	%	I.C. <sup>1</sup>	n	%	I.C. <sup>1</sup>
Pancitopenia	37	94.9	3.5	2	5.1	6.9
Trombocitopenia y anemia	15	93.8	7.6	1	6.3	11.9
Trombocitopenia y leucopenia	3	60.0	31.7	2	40.0	42.9
Trombocitopenia	2	66.7	40.1	1	33.3	53.2
Anemia	1	11.1	12.4	8	88.9	20.5
Anemia y leucopenia	0	0	0	1	100.0	0
No citopénicos	0	0	0	4	100.0	0

<sup>1</sup> Intervalo de confianza del 95%

Cuadro 3. Frecuencia de signos clínicos encontrados en 77 casos compatibles con ehrlichiosis canina frente a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* (2002-2004)

Signo Clínico	Positivo			Negativo		
	n	%	I.C. <sup>1</sup>	n	%	I.C. <sup>1</sup>
Epistaxis	11	100.0	0	0	0	0
Equimosis	12	92.3	11.3	1	7.7	14.5
Postración	9	81.8	20.5	2	18.2	25.7
Linfadenomegalia	4	80.0	24.7	1	20.0	35.1
Petequias	11	78.6	16.3	3	21.4	21.3
Pérdida de peso	18.3	78.3	13.5	5	21.7	16.9
Mucosas pálidas	13	76.5	12.2	4	23.5	20.3
Melena	3	75.0	32.3	1	25.0	42.4
Fiebre	30	73.2	9.8	11	26.8	13.6
Depresión	36	70.6	8.3	15	29.4	12.5
Vómitos	5	71.4	26.6	2	28.6	33.6
Anorexia	31	68.9	7.9	14	31.1	13.5

<sup>1</sup>Intervalo de confianza del 95% y 0.05 de nivel de significancia

po de proteínas de membrana externa de 30 *kDa* (p30) (Unver *et al.*, 2003), las cuales han sido recombinadas y utilizadas para la detección mediante el ELISA directo. Por otro lado, las bondades del examen hematológico para el diagnóstico de esta enfermedad tiene una importancia principalmente económica, ya que el diagnóstico es de bajo costo, comparado con el costo de la prueba comercial de ELISA.

Las alteraciones hematológicas (trombocitopenia, leucopenia y anemia) son frecuentes en los casos de ehrlichiosis canina (Ettinger, 1992). En el presente estudio se obtuvo que el  $90.5 \pm 7.3\%$ , el  $88.9 \pm 9.2\%$  y el  $82.1 \pm 9.2\%$  de los casos con trombocitopenia, leucopenia y anemia, respectivamente, evidenciaron anticuerpos contra *E. canis*. Esto indica, además, que en el medio, el principal agente causal pertenece al género Ehrlichia, teniendo a *E. canis* como la bacteria mayormente involucrada, deducción realizada en base a los signos clínicos y hallazgo de inclusiones intracitoplasmáticas (formas densas y ligeras) en leucocitos circulantes (Fig. 1). Este dato es de gran importancia para la Salud Pública, ya que las bacterias del género Ehrlichia, incluyendo a *E. canis* son causales de infección en humanos (Pérez *et al.*, 1996).

El antecedente clínico de contacto con artrópodos fue estadísticamente significativo en perros seropositivos, lo que confirma el rol del *Rhipicephalus sanguineus* como vector de agentes microbianos causantes de la ehrlichiosis canina, ampliamente reportado por otros autores (Harrus *et al.*, 1999).

Dentro de las citopenias observadas, la pancitopenia fue la de mayor relevancia, ya que de los 37 perros pancitopénicos, el  $94.9 \pm 3.5\%$  evidenciaron anticuerpos contra *E. canis*. Además, los cuadros bicitopénicos fueron también frecuentes, ya que de 16 perros con bicitopenia (trombocitopenia y anemia) el  $93.8 \pm 7.6\%$  fueron positivos a anticuerpos contra *E. canis*. Estos resultados son impor-

tales para el diagnóstico hematológico, ya que indican que un animal con signos clínicos compatibles a ehrlichiosis canina, que manifieste pancitopenia bicitopenia (trombocitopenia y anemia), es muy probable que esté cursando con la enfermedad. Datos similares han sido reportados por otros autores (Ettinger, 1992; Greene, 1997).

Finalmente, la evaluación de las razas indicó que el Pastor Alemán, así como las demás razas (incluyendo los cruces), no evidenciaron diferencia significativa respecto a la presencia de anticuerpos contra *E. canis*; es decir, racialmente, los animales tienen la misma probabilidad de sufrir la infección por *E. canis*. Además, se encontró que el Pastor Alemán tampoco evidenció diferencias respecto a la manifestación de signos hemorrágicos (epistaxis, equimosis, petequias, etc.), a diferencia de los caninos de razas nórdicas (Siberiano y Samoyedo), los cuales en un 100%, evidenciaron cuadros hemorrágicos, principalmente epistaxis y equimosis. Estos resultados pueden ser explicados debido a que posiblemente el Pastor Alemán local se ha cruzado con animales de otras razas, lo que quizás ha modificado su respuesta inmune haciéndolos menos vulnerables frente a microorganismos del género Ehrlichia.

## CONCLUSIONES

- ? Debido al grado de concordancia ( $84.7 \pm 11.0\%$ ) el examen hematológico es de gran utilidad en el diagnóstico de la ehrlichiosis canina en el país, teniendo a la técnica directa de ELISA como una prueba confirmatoria.
- ? La presencia de trombocitopenia, leucopenia y anemia, así como el antecedente de garrapatas, son de gran importancia en el diagnóstico hematológico y clínico, respectivamente, en casos con sospecha clínica de ehrlichiosis canina.

## LITERATURA CITADA

1. **Adrianzén J. 2002.** Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en los distritos de Chorrillos. La Molina y San Juan de Miraflores. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 68 p.
2. **Aguirre E, Sainz A, Dunner S, Amusatogui I, López L, Rodríguez-Franco F, Luaces I, Cortés O, Tesouro MA. 2004.** First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet Parasitol* 125: 365-372.
3. **Benjamín M. 1991.** Manual de patología clínica en veterinaria. 3<sup>ra</sup> ed. México DF: Limusa. p 61-205.
4. **Breitschwerdt E, Hegarty B, Hancock S. 1998.** Secuential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol* 36: 2645-2651.
5. **Ettinger SJ. 1992.** Tratado de medicina interna. Enfermedades del perro y del gato. México DF: Inter-Médica. p 297-299.
6. **Greene RT. 1997.** Ehrlichiosis canina: Implicaciones clínicas de factores humorales. En: *Terapéutica veterinaria de pequeños animales*. Kirk (ed). 12<sup>a</sup> ed. p 317-320. McGraw-Hill Interamericana. México.
7. **Harrus, S.; T. Waner; H. Bark; F. Jongejan; A.W.C.A. Cornelissen. 1999.** Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 71: 251-252.
8. **IDEXX Laboratories. 2002.** Kit canino para la prueba de antígenos de *Dirofilaria immitis* y anticuerpos de *Borrelia burgdorferi* y de *Ehrlichia canis*. IDEXX Laboratories. Maine EE.UU. 27 p.
9. **Kordick S, Breitschwerdt E, Hegarty B, Southwick K, Colitz C, Hancock S, Bradley J, Rumbough R, McPherson J, MacCormack J. 1999.** Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* 37: 2631-2638.
10. **López J, Castillo A, Muñoz M, Hildebrant S. 1999.** Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. *Arch Med Vet* 31: 211-214.
11. **Pérez M, Rikihisa Y, Wen B. 1996.** *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol* 34: 2133-2139.
12. **Rodríguez-Vivas RI, Albornoz REF, Bolio GEM. 2005.** *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet Parasitol* 127: 81-85.
13. **Unver A, Perez M, Orellana N, Huang H, Rikihisa Y. 2001.** Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J Clin Microbiol* 39: 2788-2793.
14. **Unver A, Ohashi N, Tajima T, Stich RW, Grover D, Rikihisa Y. 2003.** Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of *Ehrlichia canis* in dogs, ticks, and cell culture at different temperatures. *J Infect Immun* 69: 6172-6178.
15. **Yu X-J, McBride JW, Zhang X-F, Walker DH. 2000.** Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. *Gene* 248: 59-68.