



## Alteraciones hematológicas en perros (*Canis lupus familiaris*) diagnosticados con *Ehrlichia* spp. por PCR, en clínicas veterinarias del Nordeste Argentino

Mansilla, S.L.<sup>1,2,3\*</sup> ; Delgado, M.B.<sup>1,2</sup>; Rossner, M.V.<sup>1,4</sup> ; Cainzos, R.P.<sup>1</sup> ; Merino, L.A.<sup>2</sup> ; Koscińczuk, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Catedra de Patología Médica. Departamento de Clínicas. Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional Nordeste (UNNE), Sargento Cabral 2139, Corrientes, Argentina. <sup>2</sup>Consejo Nacional Investigación Científica y Técnica. (CONICET), Argentina. <sup>3</sup>Laboratorio de Bacteriología, Instituto de Medicina Regional (UNNE), Av. Las Heras 727, Resistencia, Chaco. Argentina. <sup>4</sup>Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Marcos Briolini N° 750, Colonia Benítez, Chaco. Argentina. ✉sl\_mansilla@hotmail.com

### Resumen

La ehrlichiosis es una enfermedad transmitida por vectores (ETV) que afecta a numerosas especies. Es causada por *Ehrlichia* spp. una bacteria gramnegativa, intracelular obligada, de aspecto cocoide o pleomórfica, que infecta los monocitos. El diagnóstico, a través de los síntomas clínicos, se dificulta dada la similitud de presentación con otras ETV. La evaluación de los parámetros hematológicos (hemograma y extendido sanguíneo) es la primera indicación del veterinario clínico, ya que es posible encontrar inclusiones intracitoplasmáticas (mórulas) en los monocitos. El objetivo del trabajo fue evaluar las alteraciones hematológicas de perros diagnosticados con *Ehrlichia* spp. por extendido de sangre periférica, y confirmarlo por técnica molecular (PCR). De junio/2021 a julio/2022 se analizaron muestras de perros identificando inclusiones intracitoplasmáticas en siete muestras. Se observó en 6 de 7 muestras de sangre la presencia de anemia y trombocitopenia sin alteraciones del número de leucocitos. La técnica de PCR confirmó el diagnóstico inicial en 2/7 muestras, amplificando el segmento del gen *dsb* 330/728. Se destaca la utilidad de los parámetros hematológicos junto a la confirmación diagnóstica por la técnica de PCR, siendo esta última, un método altamente sensible y específico, que ofrece hasta un 100% de seguridad en el diagnóstico detectando y amplificando el ADN de *Ehrlichia* spp.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, diagnóstico hematológico, caninos domésticos

## Hematological alterations in dogs (*Canis lupus familiaris*) diagnosed with *Ehrlichia* spp. by PCR in veterinary clinics in Northeastern Argentina

**Abstract.** Ehrlichiosis is a vector-borne disease that affects numerous species. It is caused by *Ehrlichia* spp. gram-negative, obligate intracellular bacteria with a coccoid or pleomorphic appearance that infects monocytes. Diagnosis, through clinical symptoms, is difficult given the similarity of presentation with other vector-borne disease. The evaluation of hematological parameters (hemogram and blood smear) is the first indication of the clinical veterinarian, since it is possible to find intracytoplasmic inclusions (morulae) in monocytes. The aim of this study was to evaluate hematological alterations in dogs diagnosed with *Ehrlichia* spp. by peripheral blood smear, and to confirm it by molecular technique (PCR). From June/2021 to July/2022 dog samples were analyzed and intracytoplasmic inclusions were identified in seven samples. The presence of anemia and thrombocytopenia without alterations in the number of leukocytes was observed in 6 of 7 blood samples. The PCR technique confirmed the initial diagnosis in 2/7 samples, amplifying the *dsb* 330/728 gene segment. The usefulness of hematological parameters together with the diagnostic confirmation by PCR technique is emphasized, the latter being a highly sensitive and specific method, which offers up to 100% diagnostic confidence in detecting and amplifying the DNA of *Ehrlichia* spp.

**Key words:** *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, hematologic diagnosis, domestic canines

## INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis canina es una patología frecuente en las zonas tropicales y subtropicales donde está presente su vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (*R. sanguineus s.s.*). Es considerada una enfermedad emergente tanto en humanos como en animales (zoonosis) y las poblaciones caninas son grandes reservorios y centinelas para las enfermedades infecciosas y zoonóticas (Otranto et al. 2010). La ehrlichiosis es causada por una bacteria gramnegativa, intracelular obligada, cocoide pleomórfica pequeña (0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que pertenecen al orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*, géneros *Ehrlichia*, especies *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* que parasita el citoplasma de los leucocitos circulantes (monocitos, macrófagos y granulocitos) (Breitschwerdt et al. 2014). La bacteria se multiplica por fisión binaria dentro de una vacuola citoplasmática y forma una estructura que se denomina mórula, la cual puede observarse como una inclusión granular basófila de 4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro en el citoplasma de monocitos y linfocitos coloreados con técnicas hematológicas de rutina (Allison y Little 2013).

El diagnóstico oportuno de la enfermedad es un desafío debido a las diferentes fases con que cursa la patología (subclínica, aguda y crónica) y sus múltiples manifestaciones clínicas. El período de incubación es de 7 a 10 días con trastornos multisistémicos caracterizados por fiebre, apatía, depresión, letargo, pérdida de peso, anorexia, en ocasiones vómito o diarrea con o sin hemorragia.

Las alteraciones hematológicas están asociadas a la anemia que puede cursar con petequias y equimosis. Esta anemia puede ser regenerativa en las fases agudas de la enfermedad y o arregenerativa en la fase crónica. De las alteraciones presentes en la leucograma se destacan la neutrofilia con desvío a la izquierda; la leucopenia y monocitopenia son hallazgos menos frecuentes. Los signos hematológicos asociados con mayor frecuencia son anemia (anemia regenerativa en las fases agudas de la enfermedad y arregenerativa en la fase crónica), leucopenia, trombocitopenia, petequias y epistaxis. De las alteraciones presentes en la leucograma se pueden remarcar la neutrofilia con desvío a la izquierda, en tanto que la leucopenia y monocitopenia son hallazgos menos frecuentes. En algunos caninos, la bacteria puede ser eliminada, aunque en la mayoría persiste y evoluciona a la fase crónica (Harrus 2015). El diagnóstico citológico consiste en observar microscópicamente las inclusiones citoplasmáticas en el interior de los monocitos. Además, se evalúan los diferentes componentes sanguíneos, buscando cambios morfológicos en los eritrocitos, leucocitos y/o plaquetas, así como inclusiones intracelulares coloreadas (Salazar et al. 2014).

Las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (o su sigla en inglés "PCR") permiten detectar ADN de *Ehrlichia* spp. en muestras caninas (Ruiz Barahona et al. 2018).

El objetivo del trabajo fue evaluar las alteraciones hematológicas en caninos diagnosticados con *Ehrlichia* spp. por extendido de sangre periférica, y confirmados por PCR.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, retrospectivo y transversal. Se evaluaron perros de ambos sexos sin distinción de raza y edad que concurren a cuatro clínicas veterinarias privadas, dos en la ciudad de Resistencia y dos en la ciudad Corrientes, durante el período comprendido entre junio de 2021 a julio de 2022. Se tomaron por venopunción 3 ml de sangre anticoagulada con 70  $\mu\text{l}$  de sales sódicas y potásicas de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), de los caninos considerados sospechosos. Los perros debían presentar al menos tres signos clínicos compatibles con ehrlichiosis (hipertermia, anorexia, pérdida de peso, trastornos de la coagulación, presencia de garrapatas en la piel, entre otros) para ser incluidos en el muestreo.

Se analizaron el hemograma, leucograma y recuento de plaquetas, considerando como anormal hematocritos menores a 36% y recuentos totales de glóbulos rojos menores a 5 miles/ $\text{mm}^3$ , leucopenia cuando los glóbulos blancos fueron menores a 6,3 miles/ $\text{mm}^3$ , leucocitosis cuando superara los 16 miles/ $\text{mm}^3$  y trombocitopenia cuando el recuento total de plaquetas fuera menor a 175.000 plaquetas/ $\mu\text{l}$  de sangre. Estos valores de referencia fueron tomados en base a los trabajos de Mylonakis et al. (2003) y Asawakarn et al. (2021) que analizaron estos parámetros hematológicos en caninos con erlichiosis. Las determinaciones se realizaron en un contador hematológico automático Hematology Analyzer Machine de un laboratorio de análisis clínicos privado.

A partir de cada muestra de sangre se realizaron y colorearon cinco extendidos por cada paciente sospechoso. Cada extendido se fijó con alcohol etílico al 90% durante 3 minutos y posteriormente fueron coloreados con una solución de Giemsa al 10% por 20 minutos. Los extendidos sanguíneos se observaron con microscopio óptico Celestron Labs advance, con objetivo de inmersión 100X.

Posteriormente, el diagnóstico molecular se realizó en el laboratorio de bacteriología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia Chaco. Para la extracción de ADN se utilizó un método comercial de extracción por columnas ADN High pure PCR template preparation kit, Roche®, según instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el material genético, se determinó el rendimiento mediante espectrofotometría y valoración de la pureza de ácidos nucleicos utilizando un control genómico que permite la identificación de beta-actina canina por medio de PCR convencional, para verificar la viabilidad e integridad del material extraído y purificado (Peleg et al. 2010).

Para la detección por PCR se amplificó un segmento de 409 pb del gen *dsb* 330/728 y *dsb* 321/671 *Ehrlichia* spp, utilizando condiciones de PCR previamente descritas Doyle et al. (2005) y Aguiar et al. (2014).

## RESULTADOS

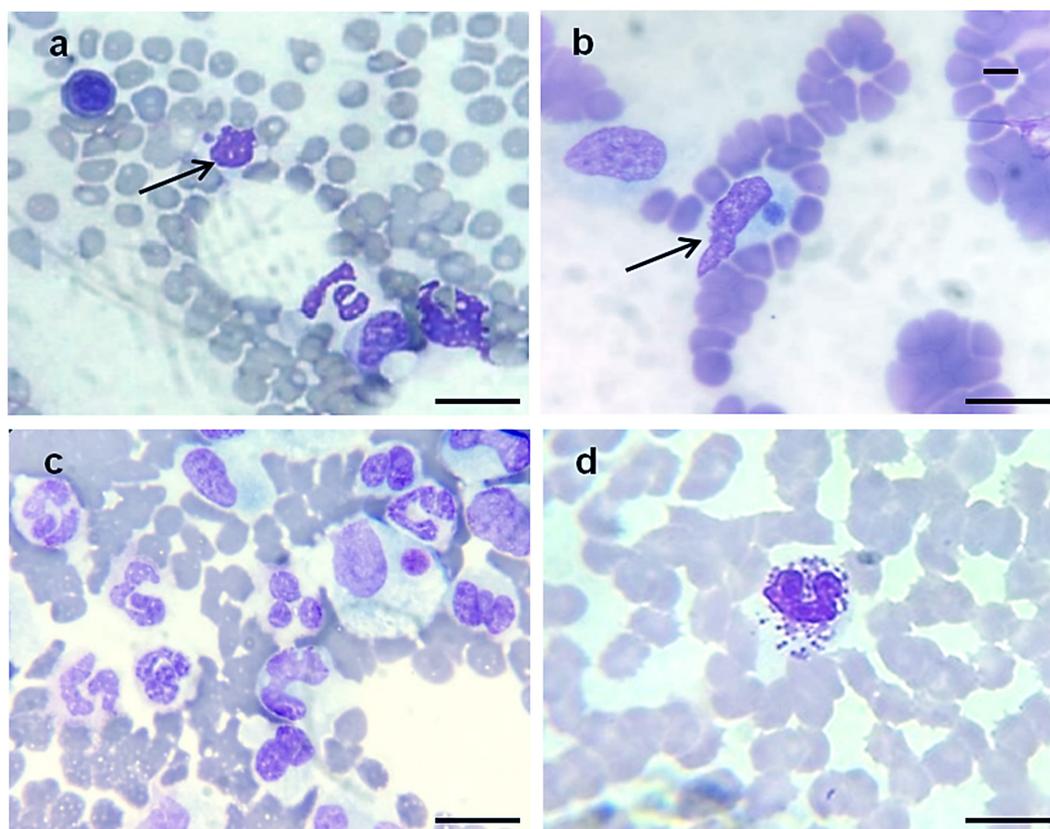
En siete caninos con sospecha de ehrlichiosis se hallaron inclusiones intracitoplasmáticas compatibles con mórulas de *Ehrlichia* spp.

La media de los parámetros hemáticos para los siete pacientes fueron los siguientes: hematocrito 28,73%, glóbulos rojos, 4,51 millones/mm<sup>3</sup> y hemoglobina 10,61%. La media de los glóbulos blancos estuvo dentro de los valores de referencia. Con respecto al recuento de plaquetas, el valor medio fue de 119.290 plaquetas/ $\mu$ l de sangre.

En el análisis microscópico de los siete extendidos, se identificaron inclusiones intracitoplasmáticas compatibles

con mórulas de *Ehrlichia* spp. Observándose, además, anisocitosis e hipocromía. Neutrófilos con cambios tóxicos y plaquetas de 5 $\mu$ m de diámetro, valor superior al diámetro medio para la especie.

La técnica de PCR permitió la amplificación de los segmentos seleccionados para la identificación de *Ehrlichia* spp. en dos de las siete muestras caninas.



**Figura 1:** a y b: Imágenes microscópicas de extendidos sanguíneos de los caninos sospechosos con erlichiosis. Se observa una inclusión intracitoplasmática compatible con mórula de *Ehrlichia* spp. (flecha). c: Se observa aumento marcado de neutrófilos en el campo con núcleos en banda y segmentados, además, se observa los gránulos púrpura visibles. d: En el centro de la imagen se observa un neutrófilo con cambios tóxicos. La anisocitosis está presente en la mayoría de los extendidos sanguíneos. Barras: a, b y c= 20  $\mu$ m. Barra: d= 15  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

Los hallazgos hematológicos del presente estudio evidencian presencia de anemia y trombocitopenia en seis de los siete casos analizados, estando en coincidencia a lo reportado por Mylonakis et al. (2003), donde el 100% de los animales evaluados presentaron anemia y el 68% trombocitopenia severa.

Kaewmongkol et al. (2017) en 73 perros en Tailandia encontraron que los valores de hematocrito eran inferiores al 31% en caninos infectados con *Ehrlichia* spp. En este estudio la media del hematocrito fue de 28,73%.

La trombocitopenia en los caninos estudiados con ehrlichiosis, se asemeja a lo reportado por Eiras (2013), que menciona que la disminución en el número de plaquetas es un indicador frecuente en la ehrlichiosis canina. Por lo tanto, la trombocitopenia podría ser un indicador de la presencia del hemoparásito en caninos junto con los signos clínicos compatibles con la enfermedad como

anorexia, hipertermia, pérdida de peso, debilidad, uveítis y convulsiones, permite establecer un diagnóstico clínico presuntivo.

La trombocitopenia se explica por el consumo de plaquetas relacionado al secuestro esplénico y la disminución de la vida útil. Esta alteración comienza unos días después de la infección junto con la hipoplasia de la médula ósea, y también se encuentra entre las principales causas de pancitopenia la destrucción a gran escala de las células del bazo (Parashar et al. 2015).

En este caso, no se encontró pancitopenia en los animales, ya que el número de leucocitos estuvo en el rango de la normalidad a diferencia de lo reportado por Parmar et al. 2013) que encontró una pancitopenia en 71% de animales con ehrlichiosis. Esto a su vez difiere de lo descrito por Das (2013) que encontraron un 17,6% de pancitopenia en los pacientes estudiados.

La observación de la bacteria en los extendidos sanguíneos resulta dificultosa, debido a que la infección

celular es alta solo en fase aguda de la enfermedad, ya que es una prueba de muy baja sensibilidad y operador dependiente (Harrus et al. 2012). La evaluación microscópica de cuerpos de inclusión, en frotis sanguíneos, resulta una técnica rápida, sencilla y económica; sin embargo, este método presenta ciertas desventajas como lo son su baja sensibilidad, atribuido principalmente a la baja carga del patógeno en la etapa aguda de la enfermedad cuando la bacteria se multiplica en micro colonias intracitoplasmáticas, lo que implica una mayor inversión de tiempo para la búsqueda de mórulas, lo cual dificulta su diagnóstico (Derakhshandeh et al. 2017).

Por otra parte, se debe considerar que los leucocitos son células con capacidad fagocítica, que ingieren gran variedad de microbios y otras estructuras que pueden causar confusión, y la observación de puntos oscuros en el citoplasma celular que no necesariamente se debe a una mórula sino a material nuclear fagocitado por monocitos, pueden observarse como inclusiones similares a *Ehrlichia* (Bai et al. 2017).

En nuestro estudio, el uso de técnica molecular permitió la confirmación de *Ehrlichia* sp. en dos caninos, dejando en evidencia la importancia de la PCR como una herramienta de detección precisa, sensible y específica para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp. Esta técnica detecta ADN del agente en fases tempranas donde no es posible detectar anticuerpos o en fases subclínicas donde el hallazgo de mórulas tiene baja incidencia.

## CONCLUSIONES

Se destaca la utilidad de los parámetros hematológicos junto a la confirmación diagnóstica molecular.

La anemia y la trombocitopenia deben ser tenidas en cuenta como parte del diagnóstico complementario de rutina para la ehrlichiosis canina; sin embargo, es necesaria una técnica molecular como método de diagnóstico confirmatorio.

El diagnóstico oportuno y certero de los casos de erlichiosis en caninos, contribuye a estudiar los casos y aplicar medidas de prevención para evitar la posibilidad de propagación a los humanos a través de picaduras de garrapatas.

## ORCID

Mansilla, S.L.  <https://orcid.org/0009-0009-7619-8811>

Rosner, M.V.  <https://orcid.org/0000-0002-6359-7794>

Cainzos, R.P.  <https://orcid.org/0000-0001-8176-3461>

Merino, L.A.  <https://orcid.org/000-0002-7525-3921>

## REFERENCIAS

1. Aguiar DM, Ziliani TF, Zhang X, Melo AL, Braga IA, Witter R. *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 1:1-8.
2. Allison RW, Little SE. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 2013; 42: 127-144.
3. Asawakarn S, Dhitivat S, Taweethavonsawat P. Evaluation of the hematological and serum protein profiles of blood parasite coinfection in naturally infected dogs. *Thai J Vet Med.* 2021; 51: 723-728.
4. Bai L, Goel P, Jhambh R, Kumar P, Joshi VG. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. *J Parasit Dis.* 2017; 41: 647-54.
5. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Quorllo BA, Saito TB, Maggi RG, Blanton LS, Bouyer D. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit Vectors* 2014; 7: 298-304.
6. Caballero C. Caracterización clínica y hematológica de la ehrlichiosis canina en Arica. *Rev. Méd.* 2010. *Risaralda* 2014; 20:95-100
7. Das M, Konar S. Clinical and hematological study of canine Ehrlichiosis with other hemoprotozoan parasites in Kolkata, West Bengal, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; 3:11.
8. Derakhshandeh N, Sharifiyazdi H, Hasiri MA. Molecular detection of *Ehrlichia* sp. in blood samples of dogs in southern Iran using polymerase chain reaction. *Vet Res Forum* 2017; 4: 347-51.
9. Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corstvet RE, Hegarty BC. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. *J Mol Diagnostics* 2005; 7: 504-10.
10. Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O. First description of natural Ehrlichia canis and Anaplasma platys infections in dogs from Argentina. *Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36: 169-173.
11. Harrus S, Waner P, Mark Neer T. *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections in Greene. *Infectious diseases of the dog and cat. Fourth edition* 2012; 227-259.
12. Harrus S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet. J.* 2015; 204:239-240.
13. La cita correcta es Kaewmongkol G, Lukkana N, Yangtara S, Kaewmongkol S, Thengchaisri N, Sirinarumitr, T, Jittapalpong S, Fenwick SG. Association of *Ehrlichia canis*, *Hemotropic mycoplasma* spp. and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. *Vet. Microbiol.* 2017; 201:195-200.
14. Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, Rallis T, Fytianou A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet. Microbiol* 2003; 91: 197-204.
15. Otranto D, Dantas-Torres F. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites and vectors* 2010; 3: 2-6.
16. Parashar R, Sudán V, Jaiswal AK, Srivastava A, Shanker D. Evaluación de marcadores clínicos, bioquímicos y hematológicos en la infección natural de la ehrlichiosis monocítica canina. *J. Parasito. Dis* 2015; 40, 1351-1354.

17. Parmar C, Pednekar R, Jayraw A., Gatne M. Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. 2013. *Turk. J. Vet. & Anim. Sci.*: 2013; 37: 3,- 6.
18. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* 2010; 5: 340-9.
19. Ruiz Barahona AG and Salinas Almendárez CJ. Estudio comparativo entre las técnicas, Frotis sanguíneo, Inmunocromatografía y Biología molecular para la identificación de *Ehrlichia Canis*. *Tesis de Licenciatura molecular. Universidad Nacional Agraria. Facultad De Ciencia Animal.* 2018.
20. Salazar H, Buriticá EF, Echeverry DF, Barbosa IX. 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). *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 2014; 7: 56-63.

#### **Citación recomendada**

Mansilla, S.L.; Delgado, M.B.; Rossner, M.V.; Cainzos, R.P.; Merino, L.; Koscinczuk, P. Alteraciones hematológicas en perros (*Canis lupus familiaris*) diagnosticados con *Ehrlichia* spp. por PCR, en clínicas veterinarias del Nordeste Argentino. *Rev. Vet.* 2023; 34(2): 91-95. doi: <http://dx.doi.org/>