



Universidad Nacional del Nordeste  
Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

**PROYECTO/TRABAJO FINAL DE GRADUACION**

**-MODULO DE INTENSIFICACION PRÁCTICA-**

**OPCION:** CLINICA DE PEQUEÑOS ANIMALES.

**TEMA:** “CORRESPONDENCIA EN EL HALLAZGO DE EHRlichia CANIS EN FROTIS DE SANGRE PERIFERICA DE PERROS Y MANIFESTACIONES CLINICAS DE SINTOMAS”.

**LUGAR DE RESIDENCIA:** Clínica veterinaria “El campito”, Quitilipi-Chaco.

**TUTOR EXTERNO:** M.V. Serrano Walter Oscar.

**TUTOR INTERNO:** M.V. Amarilla Oscar.

**RESIDENTE:** Morguenstern, Ingrid Anahí

**e-mail:** [ingridmorguenstern@gmail.com](mailto:ingridmorguenstern@gmail.com)

## ÍNDICE

<u>Resumen.....</u>	<u>Pág. 1</u>
<u>Introducción.....</u>	<u>Pág. 2</u>
<u>Objetivos.....</u>	<u>Pág. 6</u>
<u>Materiales y métodos.....</u>	<u>Pág. 7</u>
<u>Resultados y discusión.....</u>	<u>Pág. 10</u>
<u>Conclusión.....</u>	<u>Pág. 16</u>
<u>Bibliografía.....</u>	<u>Pág. 17</u>

## Resumen:

La ehrlichiosis canina es una enfermedad infecciosa emergente transmitida por garrapatas, producida por *Ehrlichia spp.*, una alfa-proteobacteria Gram negativa, del orden Rickettsiales y familia Anaplasmataceae, la cual afecta a miembros de la familia Canidae. Intracelulares obligatorias, redondeadas y pleomórficas. Estas bacterias se localizan en vacuolas rodeadas de membranas denominadas mórulas en el citoplasma de células sanguíneas y pueden tener tropismo por linfocitos, monocitos y granulocitos. Históricamente la enfermedad es endémica en regiones tropicales y subtropicales.

El siguiente trabajo consta de un estudio realizado a 40 caninos, que recurrieron a la clínica veterinaria “El campito”, Tales pacientes acudieron, en la búsqueda de resolver diversas entidades morbosas que los aquejaban, como así también para controles rutinarios de status sanitario.

El objetivo, es determinar la presencia de mórulas de *Ehrlichia spp.* en los frotis de sangre periférica de los 40 pacientes, con el fin de determinar la relación que existe entre las manifestaciones clínicas de ehrlichiosis y el hallazgo de las mórulas, como así también detectar si pueden presentarse en individuos asintomáticos.

A pacientes caninos, en un rango de edades desde los 6 meses hasta 13 años, se les tomó una muestra de sangre periférica, la cual se extrajo por punción con aguja 25/8 de la cara interna de la punta del pabellón auricular, previo consentimiento de sus propietarios, con el fin de determinar por medio de la realización de un extendido sanguíneo, coloreado con Giemsa y posterior visualización en microscopio óptico al 100x con aceite de inmersión, la presencia de mórulas de *Ehrlichia spp.* y la relación que existía entre dichos hallazgos con manifestación clínica de síntomas.

Un total de 25 pacientes se encontraban sintomáticos y 15 pacientes asintomáticos. De ese total de individuos sintomáticos 5 fueron diagnosticados con ehrlichiosis por medio del hallazgo de mórulas en sus muestras, en tanto 2 de los asintomáticos las presentaban. 15 sintomáticos tenían garrapatas o lesiones provocadas por las mismas, todos se encontraban con un cierto grado de anemia, decaimiento, pérdida ponderal, linfadenomegalia de ganglios de exploración rutinaria, en tanto la manifestación más llamativa fue el sangrado

excesivo en el lugar de la punción para la toma de muestras, lo mismo ocurrió en uno de los 2 individuos asintomáticos. La presencia de morulas no fue un hallazgo constante en todos los individuos que presentaron síntomas de ehrlichiosis, por lo que es importante destacar que, la ausencia de las inclusiones, no descarta la enfermedad, como así también en muy raras ocasiones, es posible encontrar morulas en muestras de individuos aparentemente sanos.

### Introducción:

Ehrlichiosis es un grupo de enfermedades transmitidas por garrapatas, que están causadas por bacterias intracelulares Gram negativas [ poseen una pared estructuralmente semejante a la de las bacterias Gram-negativas, de ahí su clasificación, pero no presentan lipopolisacáridos (LPS) ni capa de peptidoglicanos] que afectan a las células sanguíneas. La enfermedad se clasifica en función del hospedador y tipo de célula afectada. Los organismos de *Ehrlichia spp.* forman agregados dentro del citoplasma principalmente de monocitos, [y con cierta frecuencia, compromiso de las tres series hematológicas] que recibe el nombre de mórula. Una mórula está compuesta por un grupo de pequeños organismos, la cual se tiñe como una pequeña inclusión punteada azul oscura. Dentro de la misma célula se pueden observar una o más mórulas. (Valenciano AC. et al., 2016). No obstante, las mórulas de *Ehrlichia* son muy difíciles de detectar en el frotis. Así se ha demostrado que en perros con ehrlichiosis aguda, después de ver 1000 campos en un frotis de sangre (aproximadamente una hora en el microscopio), se puede ver una mórula de *Ehrlichia* en solo 8% de los casos (Cerón Madrigal J. 2015).

De Castro M.B. (2004) señala que su distribución se corresponde a su vector *Rhipicephalus sanguineus*, (garrapata marrón del perro) predominando así en áreas tropicales y subtropicales.

Esta enfermedad fue descrita en el año 1935 en Argelia, a partir de experimentos realizados con perros. El agente descubierto fue llamado en un inicio *Rickettsia canis*, pero posteriormente renombrado en 1945, como *Ehrlichia canis* en honor al bacteriólogo alemán Paul Ehrlich. Hasta la fecha se han encontrado muchas especies de esta bacteria en nuestros

animales domésticos (López, et al. 2003). Desde el año 2001, las bacterias del género *Ehrlichia spp.* pertenecen al grupo alfaproteobacteria, orden Rickettsiales y familia Anaplasmataceae [contrariamente a lo que ocurre con el género Rickettsia, estas bacterias permanecen en la vacuola del leucocito, hecho que propicia a la formación de mórulas visibles al microscopio] (Dumbler et al. 2001, Bowman 2011).

*E. canis* es la más común y grave de las causas de enfermedad, [causante de ehrlichiosis monocítica canina, como así también, pero en menor medida por *Ehrlichia chaffeensis*] (Cauto et al. 2002). La enfermedad puede ser aguda a crónica. Los signos clínicos varían de leves a severos y pueden incluir fiebre, letargia, anorexia, aumento de linfonodos, y bazo, alteraciones del sangrado, vómitos o diarrea, cambios oculares y signos neurológicos. Las alteraciones del hemograma pueden incluir uno o todo lo siguiente: anemia no regenerativa, trombocitopenia y neutropenia (Valenciano AC. et al., 2016). Se considera que la trombocitopenia es la anormalidad hematológica más común y consistente de perros infectados natural o experimentalmente con *E. canis*; ésta ocurre en más del 90% de los perros infectados. La trombocitopenia se atribuye a diferentes mecanismos en las diferentes etapas de la enfermedad. En la etapa aguda [ periodo de incubación de 8 a 20 días y duración de 2 a 4 semanas] la trombocitopenia se atribuye al consumo de plaquetas incrementado debido a procesos inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos (vasculitis), aumento del secuestro esplénico de plaquetas y destrucción inmunológica o lesión que resulta en una disminución de la vida media plaquetaria inmune mediada (Harrus et al. 1999, Harrus 2015). En la fase sub-clínica o asintomática, que puede durar 40-120 días o años con infección persistente y trombocitopenia leve (...) en tanto en la fase crónica la trombocitopenia es irrelevante, y es notable destacar una nefropatía con pérdida de proteínas, como una glomerulonefritis que se origina por depósito de inmunocomplejos sobre los capilares del glomérulo, lo que da lugar a proteinuria que en algunos casos puede llevar a hipoalbuminemia lo que explicaría otro síntoma que se puede observar en la ehrlichiosis ;edemas en la parte ventral del cuerpo (extremidades, escroto), disnea o tos por el edema intersticial a nivel del pulmón, hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía. Signos oculares (cambio de color en los ojos, ceguera y con bastante frecuencia uveítis, hipema, retinitis, desprendimiento de retina), como otra consecuencia de la glomerulonefritis, ya que son animales que tienden a hipertensión sistémica, alteraciones

neuromusculares principalmente causadas por meningitis inflamatoria o hemorrágica (hiperestesia, estados de estupor, o convulsivos), cojeras, rigidez en la marcha por depósitos de inmunocomplejos en las articulaciones (Domínguez. 2011).

Ehrlichiosis granulocítica está causada por *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum* (formalmente *E. equi* y *E. phagocytophilia*). Las morulas se observa, principalmente, en el citoplasma de neutrófilos. La enfermedad, los signos clínicos y los cambios en el hemograma son, en general, los mismos que en la ehrlichiosis monocítica canina. Sin embargo, la poliartritis supurativa es más común en la ehrlichiosis granulocítica. (Valenciano AC. et al., 2016).

Es una infección potencialmente mortal, tanto para los perros domésticos como para otros miembros de la familia Canidae (Pyle, 1980; Waner y Harrus, 2000). Afecta a perros de distintas edades y se ha informado en perros de dos meses a 13 años (Kuehn y Gaunt, 1985). La sospecha clínica puede confirmarse mediante el hallazgo de mórulas e inclusiones de *Ehrlichia spp.* en leucocitos de frotis de sangre (Andereg y Passos, 1999; Oriá et al., 2004). En sangre periférica se observan en agrupaciones bacterianas intracitoplasmáticas (Harrus et al., 1999).

La identificación de una mórula es diagnóstica de ehrlichiosis (Valenciano AC. et al., 2016).

Raramente se ha descrito algún caso en gatos infectados con *Anaplasma phagocytophilum*. (Valenciano AC. et al., 2016). La ehrlichiosis en felinos domésticos es una enfermedad recientemente diagnosticada. El cuadro clínico más frecuente es fiebre, que suele ir unida a anorexia y apatía, aunque también se han descrito muchos otros síntomas. Tal y como ocurre en la ehrlichiosis canina, los hallazgos más habituales en la analítica sanguínea son anemia y trombocitopenia. Debido a la poca especificidad de los signos clínicos y a lo poco que se conoce todavía de esta enfermedad, para llegar a un diagnóstico de ehrlichiosis felina se considera necesario realizar un buen diagnóstico diferencial en gatos con un cuadro clínico compatible con esta enfermedad (Tesouro M.A. et.al. 2004).

*Ehrlichia canis* y potencial zoonótico:

*E. canis* es un patógeno de constante investigación, pues ha sido aislado de un humano en Venezuela, por lo que el riesgo zoonótico de este agente parece confirmarse (Pérez, et al. 1996). En el 2006, mediante PCR, (...) un estudio detectó un 30% de seropositivos en pacientes con sintomatología compatible a Ehrlichiosis, constituyendo este el primer reporte de infección por *E. canis* en humanos (Pérez & Bodor ,2006).

#### Objetivos:

- Determinar hallazgos de morulas de *E. canis* en las muestras tomadas.
- Confrontar dichos hallazgos de las muestras con el examen clínico.
- Establecer pacientes sintomáticos y asintomáticos, en los que fue posible encontrar morulas.

#### Materiales:

- ✓ Portaobjetos
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Giemsa
- ✓ Alcohol 96°
- ✓ Algodón
- ✓ Aguja 25/8

### Método:

-El trabajo se realizó en el establecimiento “El campito” del M.V. Walter Oscar Serrano, situado en calle La Rioja 809, localidad de Quitilipi-Chaco.

Determinada la toma de dos muestras por paciente a analizar, se procedió todas las veces de igual manera, limpieza del pabellón auricular con algodón y alcohol, posterior punción con aguja de la cara interna de la punta de pabellón auricular, presión en la zona para la extracción de una gota de sangre con la cual se realizó el extendido en un portaobjetos, posteriormente secado, fijado con alcohol 96°, coloreado con Giemsa para proceder a la visualización de la muestra en microscopio óptico en todos sus aumentos hasta 100x con aceite de inmersión para dicho aumento.

### Resultados y discusión:

Los resultados fueron puestos en dos grupos para una mejor comprensión en “sintomáticos y asintomáticos”. A su vez dentro de dichos grupos, se determinó la presencia o ausencia de morulas de Ehrlichia en las muestras tomadas, teniendo en cuenta las manifestaciones clínicas presentadas en los pacientes puestos a evaluación.

Se tomo en consideración a los pacientes caninos que presentaban garrapatas, haciendo énfasis en aquellos que se encontraban infestados por ellas, como así también individuos con mucosas pálidas, debilitados, de bajo peso para su talla, perros de campo, callejeros rescatados, con planes sanitarios incompletos, gerontes, etc. y todos aquellos que cuenten con alguna signología que posibilite y predisponga a la presentación de la enfermedad.

<b><u>Nº de pacientes sintomáticos: 25</u></b>	<b><u>Nº de pacientes asintomáticos: 15</u></b>
<b>5 pacientes con morulas en frotis de extendido sanguíneo de sangre</b>	<b>2 pacientes con morulas en extendido de frotis sanguíneo de sangre periférica:</b>



**periférica:**

**3 perros se encontraban por debajo de los 7 años y 2 por encima de los 7 años.**

- 15 pacientes, del total de los 25 perros sintomáticos presentaban garrapatas y/o lesiones producto de las mismas.

Perros por debajo de los 7 años:

Presentaron síntomas leves e inespecíficos, tales como:

- ✓ Anemia leve (exceptuando un individuo)
- ✓ 2 perros presentaron rinotraqueitis infecciosa canina.: atribuible a cambios climáticos bruscos más una inmunidad inadecuada (bajo recuento de glóbulos blancos.)
- ✓ Dificultad en la formación del tapón plaquetario luego de extraída la gota de sangre de muestra de capilares del pabellón auricular (atribuible a trombocitopenia y/o secuestro)
- ✓ T° por encima de los 39 °c para dos pacientes
- 5 perros de los 5 pacientes presentaron anorexia variable, y pérdida ponderal en menor o mayor medida
- 5 de 5 perros presentaban

**Se presentaron a la clínica con el fin de actualizar sus planes sanitarios**

- 1 de los 2 perros presentaba según su propietaria, una secreción ocular leve, la cual fue removida antes de acudir a la consulta. El mismo paciente presento dificultad en la formación del tapón plaquetario luego de extraída la muestra de sangre periférica de la punta del pabellón auricular.
- Ambos individuos se encontraban por debajo de los 2 años.
- Ambos perros presentaron agrandamiento de linfonodos en grado variable.

<p>linfadenomegalia</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dificultad respiratoria en 1 paciente</li> </ul> <p><b>Según lo expuesto podría decirse que se encuentran en el rango de una fase aguda y subaguda.</b></p> <p><u>Pacientes por encima de los 7 años:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Anemia más marcada</li> <li>✓ Hemorragias recurrentes (sangrado en lesiones provocadas por garrapatas)</li> <li>✓ Nefropatía perdedora de proteínas (un perro con edema escrotal),</li> <li>✓ Dificultad respiratoria más marcada</li> <li>✓ Hepatomegalia (a la palpación) y linfadenomegalia.</li> </ul>	
<p><b>12 pacientes sin morulas con sintomatología:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sintomatología inespecífica, atribuible a otras entidades morbosas (babesiosis canina, u otras enfermedades de tipo multi sistémicas relacionadas con la disfunción de órganos específicos como glomerulonefritis, entre otras).</li> </ul>	<p><b>13 pacientes sin morulas ni sintomatología:</b></p> <p>Sin más especificaciones.</p>
<p><b>8 pacientes sin morulas con sintomatología manifiesta y presunta de ehrlichiosis:</b></p>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sospecha de Ehrlichiosis en fase aguda, se recomienda la realización de un nuevo frotis sanguíneo de sangre periférica.</li> </ul>	
---	--

Los resultados obtenidos, concuerdan con lo expuesto por Cerón Madrigal 2015, respecto al dificultoso hallazgo de morulas en individuos presuntamente afectados por esta enfermedad, a pesar de que en la mayoría de los caninos evaluados con sintomatología manifiesta se encontraban bajo las condiciones adecuadas (deficiente plan sanitario, con pulgas y garrapatas, alimentación desbalanceada, hábitat propicio, época del año, etc.). No obstante, el hallazgo de morulas en los frotis de sangre periférica de 5 perros realizados en un total de 25 pacientes sintomáticos, coincide con Valenciano 2016, hecho que se considera diagnóstico definitivo de esta enfermedad. Sin embargo, se encontró morulas en dos caninos asintomáticos, poniendo en evidencia que no siempre pueden acompañarse hallazgos de *Ehrlichia canis* con síntomas de ehrlichiosis como postula este autor.

Como determino Castro M.B. 2004, el tipo de clima es un factor fundamental para la alta concentración de garrapatas, y al ser esta una zona subtropical sumado al deficiente conocimiento por parte de todos los propietarios con respecto a cómo se debería manejar un adecuado saneamiento para poder eliminarlas, los perros en general se encuentran muy vulnerables a padecer ehrlichiosis como también otras enfermedades transmitidas por estos vectores.

La trombocitopenia en 18 de los 25 pacientes sintomáticos, y en uno de los pacientes asintomáticos que presento morulas en su extendido, tal como lo manifiesta Harrus 1999-2015, se puso en evidencia por el tiempo en que tardo en parar el sangrado luego de extraída la muestra para realizar el extendido, que en los casos más severos llego a ser tan manifiesta, al caer sangre en forma de gotas sobre la camilla donde se realizó el examen físico y toma de muestra de los pacientes. En uno de los casos un propietario extrajo una garrapata antes de traer al perro a la consulta, declarando que no dejaba de sangrar la lesión provocada por la misma.

Por medio de la exploración en el frotis sanguíneo, se comprobó que la cantidad de plaquetas eran bajas, formando pequeños grupos o bien ubicándose en los bordes del extendido. Todos estos factores sumados, dan la pauta entonces que la trombocitopenia es la sintomatología más frecuente y común en los animales con ehrlichiosis como lo exhibe Valenciano 2016.

La anemia fue la segunda sintomatología más constante, en la mayor parte de los casos (pacientes sintomáticos) la misma se manifestaba a modo de una baja densidad de eritrocitos en las distintas partes del frotis (atribuible a la reacción inmunomediada y hemolisis provocada por ehrlichiosis), como así también hipocromía (la hipocromía se atribuye siempre a poca hemoglobina, indicando deficiencia de hierro, en este caso por pérdida crónica de sangre por ectoparásitos). Todos estos hallazgos concuerdan con lo postulado por Valenciano 2016.

Domínguez 2011, nos plantea una hipoproteinemia atribuible a una glomerulonefritis provocada por la formación de inmunocomplejos, que trae como consecuencia la formación de edemas en las partes bajas del cuerpo, síntoma muy manifiesto en uno de los pacientes, lo que refuerza lo expuesto por este autor.

Un agrandamiento abdominal, por hepatomegalia a la palpación (en los dos pacientes sintomáticos por encima de los 7 años), como así también nódulos linfáticos aumentados de tamaño nos indican una reacción de tipo sistémica. En los 2 caninos asintomáticos que presentaron morulas en sus muestras, la linfadenomegalia fue el único indicativo que se pudo encontrar sin realizar pruebas serológicas ni otro tipo de examen complementario.

### Conclusión:

La presencia de morulas no fue un hallazgo constante en todos los individuos que presentaron síntomas de ehrlichiosis, por lo que es importante destacar que, la ausencia de las inclusiones, no descarta la enfermedad, como así también en muy raras ocasiones, es posible encontrar morulas en muestras de individuos aparentemente sanos. Sin embargo, ya que uno de los pacientes asintomáticos manifestó un sangrado excesivo y a la exploración del frotis sanguíneo pocas plaquetas, es menester poner en evidencia que esta manifestación es uno de los síntomas más temprano de ehrlichiosis según mi experiencia, dada la falta de otras manifestaciones clínicas en el canino. Concluyendo, que, al ser una enfermedad de sintomatología generalmente inespecífica, y que cuenta con fases bien diferenciadas, hay que tomar en consideración todas las condiciones del paciente para poder arribar al diagnóstico en ausencia de la confirmación por medio del frotis.

## Bibliografía:

ANDEREG, PI; PASSOS, LMF Ehrlichiosis canina: revisión. Rev. Clin. Vet., V.4, p.31-38, 1999.

BOWMAN DD. 2011. Introduction to the alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia, and Anaplasma. Top. Companion. Anim. Med. 226(4):173-177.

COUTO, G; RICHARD, N Manual de medicina interna de pequeños animales. Harcourt, Mosby, p. 805-808, 2002.

DE CASTRO MB, MACHADO RZ, DE AQUINO LPCT, ALESSI AC, COSTA MT. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet. Parasitol. 119(1):73-86.

DUMBLER, BARET, BEKKER, DASH, & PALMER. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51:2145-2165.

DOMINGUEZ, G. (2011.). "Prevalencia E Identificación De Hemoparásitos (Ehrlichia Canis, Babesia Canis Y Anaplasma Phagocytophilum) En Perros De La Ciudad De Cuenca". Universidad de Cuenca, facultad de ciencias agropecuarias.

HARRUS S. 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). Vet. J. 204(3):239-240

HARRUS S, WANER T, BARK H, JONGEJAN F, CORNELISSEN AWCA. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 37(9):2745-2749.

KUEHN, NF; GAUNT, SD Hallazgos clínicos y hematológicos en la ehrlichiosis canina. J. Am. Vet. Med. Assoc., V.186, p.355-358, 1985.

LOPEZ J, CASTILLO A, MUÑOZ M, HILDEBRANT S. 2003. Hallazgo de Ehrlichia canis en Chile, informe preliminar. Arch Med Vet 31: 211-214.

ORIÁ, AP; PEREIRA, PM; LAUS, JL Uveítis en perros infectados por Ehrlichia canis. Cienc. Rural, v.34, p.1289-1295, 2004.

PEREZ M, RIKIHISA Y, WEN B. 1996. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J. Clin. Microbiol.34(9):2133-2139

. PEREZ M, BODOR M, ZHANG C, XIONG Q, RIKIHISA Y. 2006. Human infection with

Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078:110-117.

PYLE, RL Ehrlichiosis canina. J. Am. Vet. Med. Assoc., V.177, p.1197-1199, 1980.

TESOURO MA. 2004. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Spain. Vet Parasitol 125: 365-372.

VALENCIANO, EC; COWEL, RL; RIZZI, TE; TYLER, RD Atlas de frotis de sangre periférica en perros y gatos, 1edición, p.183-185, 2016.

WANER, T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis monocítica canina. En: \_\_\_\_\_ Avances recientes en enfermedades infecciosas caninas. Ithaca: LE Carmachael, 2000.

WOODY, BJ; HOSKINS, JD Enfermedades ehrlichiales de los perros. Vet. Clin. N. Am.: Pequeños Anim. Pract., V.21, p.75-98, 1991.