

## **Descripción de dos casos clínicos de *Erlichiakanis***

Mansilla Fernández, Silvia Lorena; Delgado, María Belén; Coronel Cinthia, Cainzos, Romina Paola; Koscinczuk, Patricia.

Catedra de Patología Médica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste. [pkoscinczuk@hotmail.com](mailto:pkoscinczuk@hotmail.com)

### **RESUMEN**

Se describe la presentación clínica de dos caso de *Erlichiakanis* confirmados por biología molecular(PCRconvencional).Mientras que uno de los pacientes sólo presentó pérdida de peso, anorexia y dificultad para defecar, en el otro se observó anorexia, conjuntivas y mucosas aparentes pálidas, petequias, disnea, uveítis,depresión cognitiva y convulsiones, con ataxia de tren posterior e hipotermia.

En el hemograma, ambos pacientes presentarontrombocitopenia (76 y 40 miles/mm<sup>3</sup> respectivamente), y solo en uno de ellos se observó anemia y leucocitosis (27,4 miles/mm<sup>3</sup> de glóbulos blancos), con un recuento absoluto de 22,194 miles/mm<sup>3</sup>de neutrófilos segmentados y 822 miles/mm<sup>3</sup> en banda. En los frotis de sangre periférica de los dos pacientes, se observaron inclusiones dentro de los monocitos, macroplaquetas y agregación plaquetaria. Tanto el perfil renal como el hepático se encontraron dentro de los parámetros normales, aunque los dos tuvieron hipoalbuminemia (2,6 y 1,8 g/dl, respectivamente), con una relación albúmina/globulina que en uno de ellos fue de 1,1 y en el otro de 2,22.El tratamiento implementado en ambos casos fue de doxiciclina a dosis de 10 mg/kg SID.

La diversidad de signos clínico, de alteraciones en el hemogama y en los perfiles de rutina hacen que el diagnóstico definitivo de *Erlichiakanissea* difícil; siendo las técnicas moleculares la metodología diagnostica de elección.

### **INTRODUCCIÓN**

La Ehrlichiosis es una enfermedad de distribución mundial, endémica en los países tropicales subtropicales en donde la seroprevalencia puede llegar a ser hasta del 33% (Jiménez Avendaño. *et al.*, 2017).

Es considerada una enfermedad emergente y potencial zoonosis debido a la proliferación de sus vectores, lo que determina un aumento de la casuística. El ciclo infeccioso necesita de un mamífero como reservorio y un artrópodo como vector (en este caso la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*) para que el agente pueda ser transmitido a un nuevo huésped. El diagnóstico definitivo de la enfermedad es un verdadero reto debido a la variedad de los síntomas clínicos (Straube. *et al.*, 2010). Se reconocen tres fases: aguda, subclínica y crónica, (Green *et al.*, 2016), pudiendo o no observarse el agente transmisor sobre la piel o en el ambiente donde vive el perro. A continuación se describen dos casos clínicos identificados por PCR convencional.

## **MATERIALES Y METODOS**

Se seleccionaron dos pacientes caninos con diagnóstico confirmado de *Ehrlichia* mediante técnica molecular (reacción en cadena de la polimerasa-PCR) que habían asistido a la consulta por motivos diferentes en cada caso.

De las muestras de sangre y suero: se obtuvieron por punción de la vena cefálica antibraquial. De los 4 ml de sangre, 1ml se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA que fue utilizado para la realización del hemograma, 2.5 ml en otro tubo sin anticoagulante para la obtención de suero sanguíneo para los perfiles bioquímicos y 0.5ml de sangre con 60 µl de EDTA, congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización, se reservaron para el diagnóstico molecular. Con el suero se realizó el perfil renal, hepático y proteinograma.

Los frotis se obtuvieron de sangre periférica mediante punción de la oreja. Se confeccionan 4 extendidos por cada paciente que fueron fijados con alcohol etílico al 9% durante 5 minutos y fueron teñidos con Tinción 15® (BIOPUR). La evaluación microscópica se llevó a cabo con microscopio binocular, con objetivo de inmersión con un aumento de 100x.

De los análisis de orina: el método de recolección fue por micción espontánea, recolectándose la muestra en frasco estéril con cierre hermético. La densidad se evaluó por refractometría y el resto de los parámetros se determinó cualitativamente mediante tiras reactivas.

De la técnica molecular: la extracción de ácidos nucleicos y la purificación, se realizó con un método comercial de extracción por columnas (High pure PCR template preparation kit, Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los ácidos nucleicos obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización para la PCR.

Los cebadores (primers) utilizados para la técnica molecular fueron genéricos, seleccionados de publicaciones previas que garantizan el haber sido probados y evaluados. (Doyle *et al.* 2005, Labruna *et al.*, 2007, Aguiar *et al.* 2007 cebadores para *Ehrlichia*).

## **DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS CLÍNICOS**

### **Caso clínico 1**

**Datos del paciente:** Paciente canino, raza caniche toy, sexo hembra entera, 2 años de edad, con 2,500kg de peso. Determinándose una condición corporal de 2 en la escala de 5. Con dificultad para defecar y que la materia fecal es pastosa y donde se observa la presencia de ectoparásitos (garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*) al momento de la consulta. Copro parasitológico negativo. Si bien el hemograma se encontró dentro de los límites normales (Tabla 1), en el frotis de sangre periférica se observaron mórulas dentro de los monocitos y macroplaquetas (Fig 2). El perfil renal y hepático dentro de los rangos de referencia (Tabla 1). En el proteinograma las proteínas totales estuvieron más bajas que lo esperado (4.9 g/ dl), la albumina fue de 2,6 g/dl, con una relación albumina globulina de 1:1)

### **Caso clínico 2.**

Paciente canino, raza doberman pinscher, sexo macho entero, 7 años de edad, con 2,500kg de peso estado corporal 3 de 5 (Figura 3). Presentó ataxia, incoordinación, disociado del medio con 3 días de anorexia. Durante la consulta, la propietaria manifestó la pérdida progresiva de peso durante un tiempo, y relata la muerte de otros caninos con síntomas semejantes. En el aparato respiratorio se observó dificultad para respirar, aumento de la frecuencia respiratoria y se auscultaron sibilancias. En tanto que en el aparato circulatorio se auscultó aumento de la frecuencia cardíaca, y se registró hipotensión. En el aparato locomotor se observó incoordinación durante la marcha y debilidad para mantenerse en estación. En los ojos se observaron úlceras

corneales superficiales evaluadas por la técnica de la fluoresceína. En la piel se observaron Petequias.

El hemograma presentó una disminución del hematocrito, el recuento de glóbulos rojos y la hemoglobina, con un recuento de glóbulos blancos alto, con desvío a la izquierda (Tabla 1). En los frotis de sangre periférica se observaron mórulas en los monocitos, agregación plaquetaria y plaquetas reactivas. En el perfil renal, una uremia prerrenal, el perfil hepático dentro de los límites normales y el proteinograma las proteínas totales fueron de 5,8 g/dl y la albumina de 1,8 g/dl (Tabla 1).

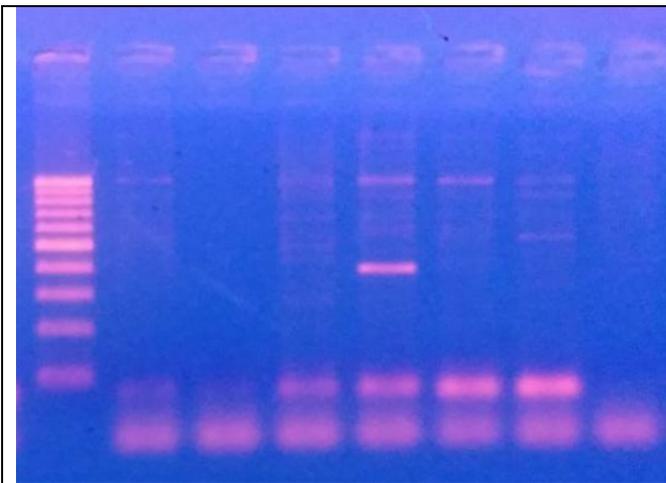


Figura 1. Corrida electroforética: a la izquierda se observa el marcador de peso molecular, y en la cuarta ubicación a partir del marcador se visualiza una banda evidente (amplificación del primer Dsd 330/728 de 409 pb).

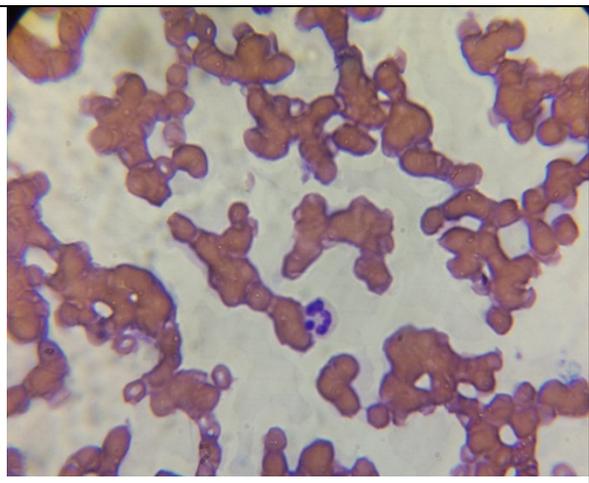


Figura 2. Frotis de sangre periférica. La flecha indica una mórula intracitoplasmática en un monocito. Tinción 15, aumento original, 100X objetivo de inmersión.



|   |   |
|---|---|
| <p>Figura 3. Dobermanpinscher , macho, de 7 años de edad. Observe depresión de la conciencia y aumento de la secreción lagrimal</p> | <p>Figura 4. Frotis de sangre periférica, se observa plaquetas reactivas agrupadas en cúmulos, la flecha indica una mórula intracitoplasmática en un monocito. Tinción Giemsa .Aumento original 100X objetivo de inmersión.</p> |
|---|---|

Del análisis de orina: En ambos pacientes, no se observaron alteraciones en los parámetros cualitativos de la tira reactiva. La proteinuria en ambos casos dio negativo a la tira reactiva.

Tabla 1. Comparación de los perfiles bioquímicos de ambos casos

| <b>HEMOGRAMA</b>         | <b>CASO 1</b>                | <b>CASO 2</b>                | <b>VALORES DE REF.</b>          |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Plaquetas                | 76 miles/mm <sup>3</sup>     | 40 miles/mm <sup>3</sup>     | 150 - 400 miles/mm <sup>3</sup> |
| Hematocrito              | 35.8 %                       | 11 %                         | 37 – 55 %                       |
| Glóbulos rojos           | 5.5 millones/mm <sup>3</sup> | 1.1 millones/mm <sup>3</sup> | 5 – 8 millones/mm <sup>3</sup>  |
| Glóbulos blancos         | 7060 miles/mm <sup>3</sup>   | 27.4miles/mm <sup>3</sup>    | 6 - 17 miles/mm <sup>3</sup>    |
| Hemoglobina              | 12.4 g/dl                    | 3 g/dl                       | 12 – 18 g/dl                    |
| Neutrófilos segmentados  | 4730/mm <sup>3</sup>         | 22194/mm <sup>3</sup>        | 3 – 10.5 miles/mm <sup>3</sup>  |
| Neutrófilos encayados    | 0                            | 822/mm <sup>3</sup>          | Hasta 400/mm <sup>3</sup>       |
| Eosinófilos              | 0                            | 2192/mm <sup>3</sup>         | 100 – 1300/mm <sup>3</sup>      |
| Linfocitos               | 1760/mm <sup>3</sup>         | 1644/mm <sup>3</sup>         | 1 – 4.8 miles/mm <sup>3</sup>   |
| Monocitos                | 282/mm <sup>3</sup>          | 548/mm <sup>3</sup>          | 200 – 1400 /mm <sup>3</sup>     |
| VCM                      | 65.1 μ <sup>3</sup>          | s/d                          | 60– 77 μ <sup>3</sup>           |
| HCM                      | 22.5 pg                      | s/d                          | 19–24pg                         |
| CHCM                     | 34.6 gr/dl                   | s/d                          | 30 – 40 %                       |
| Proteínas totales        | 4.9 gr/dl                    | 5.8 g/dl                     | 5 – 8 g/dl                      |
| Albumina                 | 2.6 g/dl                     | 1.8 g/dl                     | 2.3 – 3.4 g/dl                  |
| Globulinas totales       | 2.3 g/dl                     | s/d                          | 2.6 – 3.8 g/dl                  |
| Relaciona alb/globulinas | 1.1 g/dl                     | s/d                          | 1.1 gr/dl                       |

| <b>PERFIL RENAL</b>   |           |           |                 |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------------|
| Urea                  | 35 mg/dl  | 194 md/dl | 7 – 27 mg/dl    |
| Creatinina            | 0.6 mg/dl | 0.7 mg/dl | 0.5 – 1.8 mg/dl |
| <b>HEPATOGRAMA</b>    |           |           |                 |
| Colesterol total      | 173 mg/dl | s/d       | 135 – 260 mg/dl |
| Bilirrubina total     | 0.4 mg/dl | s/d       | 0.2 – 1 mg/dl   |
| Bilirrubina directa   | 0.2 mg/dl | s/d       | 0.1 – 0.8 mg/dl |
| Bilirrubina indirecta | 0.2 mg/dl | s/d       | 0.2 – 1 mg/dl   |
| G.O.T. (AST)          | 42 UI/ml  | s/d       | 10 – 50 UI/ml   |
| G.P.T. (ALT)          | 30 UI/ml  | s/d       | 10 – 100UI/ml   |
| Fosfatasa alcalina    | 115 UI/ml | s/d       | 23 – 300 UI/ml  |
| Glucosa               | s/d       | 65 mg/dl  | 77 – 125 mg/dl  |

\*s/d (sin datos)\*Valores de referencia obtenidos de laboratorio Marcomini

## **TRATAMIENTO**

Luego de la estabilización del medio interno con terapia de fluido y transfusión en el segundo caso clínico descrito, ambos pacientes fueron tratados con doxiciclina a la dosis de 10 mg/Kg cada 24 horas durante 28 días. La recuperación de ambos pacientes fue buena.

## **DISCUSIÓN**

La variedad de síntomas que pueden presentarse en los caninos con Ehrlichiosis canina depende de la fase de la enfermedad que esté transitando el paciente. Mientras que el paciente considerado subclínico, los síntomas serán poco claros, en las fases agudas o reagudización de una fase crónica, los signos clínicos serán muy marcados, pudiéndose observar petequias, lesiones corneales y complicaciones neurológicas. Por otra parte, se describe que hay razas de caninos en las cuales la presentación clínica serán más severas. Este es el caso de los doberman pinscher y del Pastor Aleman (Tilley. *et al.*, 2008).

En la fase aguda de la Ehrlichiosis los hallazgos más frecuentes son trombocitopenia, depresión y letargo, anorexia, pérdida de peso, fiebre, disnea y cianosis (Green. *et al.*, 2016). En la subclínica

se evidencia pérdida de peso, y en los frotis de sangre periférica y médula ósea se pueden observar aumentos de los linfocitos (Erwin, 2014), incluso, estos aumentos pueden ser tan marcados que se confunden con leucemia linfocítica. La fase crónica se caracteriza por la vasculitis, glomerulitis, hepatitis, neuropatías centrales o periféricas, uveítis, neumonitis (Ettinger, 2007).

En los perros infectados, la trombocitopenia está acompañada de disfunción plaquetaria (trombocitopatía) o a una disminución de la producción de plaquetas por parte de la médula ósea hipoplástica (hipocelularidad) (Harrus *et al.*, 2015), lo que puede ocasionar alteración del tiempo de sangría. Algunos autores señalan que solo el 50% de los perros infectados presentarán aumento de sangrados, aunque la falta de signos hemorrágicos no descartará la posibilidad de la infección por *Ehrlichia sp.* (Green. *et al.*, 2016).

Al evaluar el hemograma en uno de los pacientes se detectó un hematocrito bajo con recuento de glóbulos rojos (GR) normal, condición que se presenta según Villers. *et al.*, 2012 en la esferocitosis. Este proceso causa una anomalía en la membrana de los GR, por lo que los GR se tornan más pequeños, de forma redonda, y más frágiles. Cuando esto sucede el recuento de GR puede ser normal pero el hematocrito estará disminuido por el menor tamaño celular (Ceron, 2015). Esta alteración hace sospechar un proceso inmune.

Con respecto a los glóbulos blancos (GB) varios autores señalan que hay un aumento significativo de los mismos en respuesta al agente infeccioso, además hay que considerar la fase de la enfermedad en la que transitan los pacientes. En los frotis sanguíneos también se pueden observar monocitos reactivos, eritrogagocitosis, trombofagocitosis y megaplaquetas (Harrus y Waner, 2011). Otro de los hallazgos del leucograma tiene que ver con la linfocitosis, describiéndose linfocitosis de  $13.0 \times 10^3/\text{ul}$  (Harrus y Warner, 2011).

El daño renal pueden darse por causa del agente infeccioso directamente o como consecuencia de la enfermedad sistémica. El depósito de inmunocomplejos en el glomérulo como consecuencia de la respuesta del sistema inmune a *Ehrlichia sp.*, es una causa adicional intrínseca de fallo renal glomerular agudo o con más frecuencia crónico (renal crónica progresiva), pudiendo estar acompañada de proteinuria (Segev, 2013).

El tratamiento para la Ehrlichiosis canina es la doxiciclina, en dosis de 5mg/kg cada 12 horas o 10mg/kg cada 24 horas durante 28 días (Gutierrez. *et al.*, 2013). Estos autores a través de pruebas realizadas en varios caninos corroboraron la erradicación de *Ehrlichia sp* en la mayoría de los animales tratados en este periodo de tratamiento. Tratamientos más cortos, no lograron erradicar la presencia del patógeno cuando se hizo la confirmación por biología molecular.

## CONCLUSIÓN

El diagnóstico de Erlichiasis requiere de la habilidad de reconocer signos clínicos muy variados y alteraciones del hemograma. Actualmente en la mayoría de los consultorios veterinarios basan su diagnóstico en la observación de inclusiones intracitoplasmáticas (mórulas), pero la sola visión del frotis con mórulas no es suficiente para confirmar la enfermedad, ya que este es un método complementario poco específico. Las mórulas constituyen un paquete de bacterias rodeadas por una membrana que muchas veces no se observan con facilidad. Es por ello que se sugiere utilizar herramientas más sensibles y específicas como la biología molecular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ceron Madrigal José J. 2015. Analisis clínicos en pequeños animales. Intermédica. Buenos Aires. Argentina.
2. Costa J. 2018. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Provincial. Barcelona. España. <http://www.elsevier.es>.
3. Duarte T. *et. al.* 2013. *Rickettsia, Anaplasma e Ehrlichia*. Universidad Federal da Bahía. Instituto de Ciências da Saúde. Microbiología Veterinária.
4. Ettinger S.J., Feldman E.C., 2007. Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del perro y gato. Elsevier -HealthSciences División. 6ta Edición.
5. Green, C. *et al.* 2016. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. 3º Edición. Intermédica. Buenos Aires. Argentina.
6. Gutierrez Clara N., Perez Ybarra Luis, Agrela Irma F. 2016. Ehrlichiosis canina. Universidad de Oriente. Venezuela. Vol. 28 N°4. Pag 641-665.

7. Irwin, P. 2014. "It shouldn't happen to a dog...or a veterinarian: clinical paradigms for canine vector-borne diseases". *Journal Trends in Parasitology*, pag 104-112.
8. Jiménez Avendaño LP, Cala Centeno FA, Albarracín Navas JH, Duarte B, Luz S. 2017. La Ehrlichiosis canina: *Ehrlichia canis* (caso clínico). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* ISSN 1695-7504. España. Vol. 18: (8) 1-9. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
9. Rijnberk A., De Vries H. W. 1991. Anamnesis y exploración corporal de pequeños animales. 2da Edición. Ed. Acribia. España.
10. Segev, Gilad. 2013. *Veterinary Focus* Vol 23 N°3. Pag. 28-33.
11. Straube, J. 2010. Canine Ehrlichiosis from Acute infection to chronic disease. *CVBD (Companion vector-borne diseases) World Forum*. 7: 3-11.
12. Tilley, Larry P., Smith Francis W. 2008. *La consulta veterinaria en 5 minutos caninos y felinos*. 4ta Edición. Intermédica. Buenos Aires. Argentina.
13. Villers Elizabeth, Blackwood Laura. 2012. *Manual de diagnóstico de laboratorio en pequeños animales*. Ediciones S. Barcelona. España.