

ASOCIACIÓN DE LOS RESULTADOS DE UNA PRUEBA SEROLÓGICA (*ELISA*) Y FROTIS SANGUÍNEO EN CANINOS CON SINTOMATOLOGÍA COMPATIBLE DE EHRLICHIOSIS

PARRADO M. MVZ; VARGAS F. MVZ; HERNÁNDEZ G. MVZ MSc; VERGARA H. MV MSc.

Escuela de M.V.Z. Universidad de los Llanos

(Recibido: 4 de agosto de 2003 - Aceptado: 2 de diciembre de 2003)

RESUMEN

En la clínica Veterinaria de la Universidad de los Llanos, se muestrearon 30 caninos sin distinción de sexo, edad y raza, durante los meses de septiembre a diciembre. Dos animales clínicamente sanos, se tomaron como controles negativos y la restante población con signos compatibles de enfermedad hemoparasitaria y antecedentes de infestación con garrapatas fueron el grupo problema. La prueba de inmunoabsorción ligada a

enzimas (ELISA) fue positiva para 26 animales, correspondiente al 92.9% y negativa para 2 animales que corresponde al 7.1%. De los 26 animales positivos a la prueba serológica para Ehrlichiosis canina 9 (34.6%), fueron confirmados por la observación de mórulas dentro del citoplasma de leucocitos mononucleares. Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba de homogeneidad de proporciones (Prueba

exacta de Fisher), para encontrar el grado de correlación entre el frotis sanguíneo y la prueba serológica, $p > 0.05$; no determinando diferencias estadísticas significativas; la distribución t "student" elaborada para las variables hematológicas de los pacientes serológicamente positivos, enfrentados a los positivos por frotis sanguíneo Vs. Negativos por frotis sanguíneo; no reveló diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) indicando que el

cuadro hemático y el recuento diferencial no son orientación confiable para el diagnóstico de Ehrlichiosis, por lo que se hace necesaria la realización de pruebas serológicas específicas que ayuden a un diagnóstico definitivo en cualquier fase de la enfermedad como la prueba de ELISA.

Palabras clave:

Ehrlichia canis, hemograma, diagnóstico.

ABSTRACT

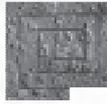
The work was carried out in the veterinary clinic of the Universidad de los Llanos, Villavicencio, 30 dogs, without distinguish of sex, age and breeding were examined in the time September or December. Two animals were took like controls and the others twenty eight, that showed compatible signs with hemoparasites and that suffered of infections ticks,

were the problem group, Ehrlichiosis ELISA test was positive to 26 animals (92%), and negative for two of them (7.1%) nine of former (34.6%) were confirmed by the microscope observation of the mórulas into the mononuclear leucocytes cytoplasm. Stastiscally the results were evaluated by the homogeneity of proportions test(exact probe of Fisher)

to find the correlation degree between blood smear and serological test, where $p > 0.05$ was not considered significant. The Student distribution, elaborated to the hematological variables of the serological positive animals, that confronted to the positive blood smear Vs negative blood smear animals, didn't show stastistically significant differences ($p > 0.05$)

indicating that hemogram and differential recount are not a good orientation for the ehrlichiosis diagnosis, so its necessary the achievement of specific serological probes that can help to establish a definitive diagnosis in any phase of the illness.

Key words: Ehrlichia canis, Elisa, hemogram, diagnosis.



INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales tropicales del municipio de Villavicencio, favorecen la presencia de parásitos como la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la cual desempeña un papel importante en la transmisión de numerosos agentes patógenos entre ellos: *Babesia sp.*, *Hepatozoon canis*, *Haemobartonella sp.* y *Ehrlichia canis*. La Ehrlichiosis canina es una enfermedad infecciosa potencialmente fatal en esta especie, así como en otros miembros de la familia Canidae que tienen distribución mundial; es causada por parásitos intracelulares obligados del género *Ehrlichia*, de la familia Ehrlichiae.

Durante la atención médica prestada a pequeños animales en la Clínica Veterinaria es frecuente encontrar caninos con signos clínicos compatibles de Ehrlichiosis; tales signos se pueden confundir con los manifestados por otras patologías, lo que hace necesario la ejecución de pruebas específicas que

permitan un diagnóstico rápido y de mayor precisión de la enfermedad.

En la actualidad, resulta difícil dar un diagnóstico confirmativo de la enfermedad en clínicas y consultorios veterinarios de Villavicencio, basados solamente en la apreciación de los signos clínicos del paciente, debido a que son inespecíficos (fiebre, anorexia, depresión, pérdida de peso, epistaxis, hemesis) (Hibbler et al 1986; Gregory y Forrester 1990; Hoskins, 1991) y a la variación presentada de acuerdo a la fase de la enfermedad. Igualmente los resultados del cuadro hemático, caracterizado por trombocitopenia, leucopenia severa y anemia; (Waner y Harrus 1997); en pocos casos se pueden asociar con la presencia del parásito en frotis de sangre periférica, debido al grado de dificultad que representa, el contar con pocas células blancas y las características mismas de la rickettsia causante de la enfermedad, por lo tanto el diagnóstico se basa

en la combinación de anamnésticos, sintomatología, anomalías hematológicas y confirmación, con la observación del parásito en los frotis sanguíneos de sangre periférica preferiblemente.

La prueba de ELISA es un análisis confiable para obtener un diagnóstico rápido de la enfermedad y está reemplazando a la prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA), ya que no requiere de equipo especializado, de tal manera que se puede practicar en centros clínicos con la dotación del kit. El snap combo kit para la detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* es un análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) del laboratorio IDEXX, que identifica una región inmunodominante P30 para lo cual utiliza anticuerpos monoclonales 111H7. Esta prueba posee una sensibilidad de 98.8% y una especificidad de 100%.

Se diseñó para detectar

anticuerpos a *Ehrlichia canis* y requiere un equipo mínimo para su elaboración (Waner et al., 2000a) y utiliza antígenos purificados de cultivos de células infectadas con *E. canis* adheridos a papel de nitrocelulosa, el cual es incubado con una solución de bloqueo para reducir reacciones inespecíficas (Waner et al., 2001).

Existen además pruebas como Western immunoblot y PCR, que ayudan a caracterizar y diferenciar los distintos microorganismos que causan ehrlichiosis (Kakoma et al., 1994), la técnica de PCR permite también un diagnóstico rápido y con sensibilidad semejante a las técnicas mencionadas anteriormente (Iqbal et al., 1994; Wen et al., 1997).

Por lo anterior, este trabajo pretende asociar una prueba serológica (ELISA) y el frotis sanguíneo, dos técnicas empleadas en el diagnóstico de Ehrlichiosis canina

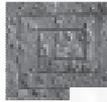
MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó durante un periodo de cuatro meses, en la clínica veterinaria de la Universidad de los Llanos. Se muestrearon 30 caninos sin distinción de raza, edad o sexo, durante el periodo de septiembre a diciembre. De los 30 animales, 2 se tomaron como

control negativo, los cuales eran animales sanos y con resultados hematológicos dentro de los rangos normales, la restante población en estudio presentó signos compatibles con enfermedad hemoparasitaria y antecedentes de infestación con garrapatas.

La recolección de muestras de sangre se realizó de la vena radial, utilizando suero para la prueba de ELISA; para esto se tomó un vial al cual se le agregó con una pipeta pasteur 0.15 ml de suero (2 gotas), a esto se adicionó 5 gotas del conjugado, se homogenizó y se

colocó todo el contenido en la bandeja designada para la muestra en el dispositivo, se selló para la activación y al cabo de 10 minutos se realizó la lectura, la cual se hizo de acuerdo a la coloración obtenida en el dispositivo de resultados.



La sangre entera se utilizó para el hemograma (hematocrito, hemoglobina, recuento total de células blancas, recuento diferencial de células blancas y

recuento de trombocitos). Además se realizaron extendidos de sangre periférica y de la capa de células blancas coloreados con Wright y Giemsa para

la observación del parásito en los leucocitos, de acuerdo a la técnica descrita por Benjamín (1984).

La prueba t de "student" se

utilizó para determinar las posibles diferencias entre los valores del cuadro hemático entre individuos positivos y negativos al frotis sanguíneo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los signos clínicos encontrados en los animales problema, fueron muy variados entre ellos los más comunes, decaimiento presentado en el 75%, membranas mucosas pálidas en el 67.86%, linfadenitis en el 67.86% y pérdida de peso en el 64.28% de los animales. La variación de los signos clínicos puede deberse a la condición corporal, a la capacidad de respuesta inmunológica y la fase de la enfermedad que presentaban los animales al momento de ser examinados.

La prueba de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), fue positiva para 26 animales, lo que corresponde al 92.9% y negativa para 2 animales (7.1%). La serología positiva en los 26 caninos, revela que estos estuvieron en contacto con el agente causal de la enfermedad y que desarrollaron títulos significativos de anticuerpos contra *Ehrlichia canis*, que acompañados por una sintomatología compatible de la enfermedad indica que los animales presentaron esta patología. Igualmente la prueba serológica positiva permite asociar mayor número de casos de *E. canis*, aunque la observación del parásito en el frotis

sanguíneo no sea posible, posibilitando así un diagnóstico confiable de la enfermedad y un tratamiento adecuado.

De los 26 animales positivos a la prueba serológica solo 9 (34.6%) fueron confirmados con la observación al microscopio de mórulas dentro del citoplasma de leucocitos mononucleares (figura 1). La identificación del parásito se realizó en linfocitos y monocitos en extendidos de células blancas que se colorearon con Wright y Giemsa siendo posible la identificación del hemoparásito con ambas tinciones, de acuerdo con lo sugerido por Baneth et al. (1996), Duque y Moreno (1998), Andereg and Passos (1999).

La prueba estadística exacta de Fisher para encontrar la correlación entre el frotis sanguíneo y la prueba serológica no fue significativa ($p > 0.05$) lo que indica que no hubo correlación entre el frotis y la serología.

En la prueba t de student, las variables del cuadro hemático (hematocrito, hemoglobina, recuento de leucocitos y trombocitos)

comparadas entre los pacientes positivos a frotis sanguíneo vs negativos al frotis, pero positivos a serología, no fueron significativos ($p > 0.05$), indicando que los resultados del hemograma no orientan el diagnóstico y esto se debió a una gran variación en los datos, por lo que se hace necesaria la implementación de otras pruebas diagnósticas específicas que nos permitan la aproximación a un diagnóstico confirmativo de Ehrlichiosis. (Figura 2)

Los rangos de hemoglobina interpretados como normales incluyeron aquellos entre 12 y 18 mg/dl. El 71.42% presentaron niveles bajos, 28% se consideró como índices normales; Los rangos normales de leucocitos se consideraron entre 5.500 y 18.000 cel/μl, el 21.43%, de los animales en estudio mostraron leucocitosis posiblemente debido a la asociación de la enfermedad con otras patologías que ocurren de manera concomitante. De igual manera se encontró que la leucopenia, solo estuvo presente en un 28.57% de los casos, lo que concuerda con lo hallado por Woody and Hoskins (1991), quienes

afirman que la pancitopenia suele resultar de la hipoplasia de la médula ósea y ocurre en la fase crónica grave de la enfermedad.

Respecto al recuento de trombocitos se consideró valor normal 400.000 cel/μl, el 89.28% de los caninos reflejaron trombocitopenia y el 10.71% presentaron valores normales. Parece ser que la trombocitopenia severa, es la anomalía hematológica más común y consistente en caninos infectados natural o experimentalmente con *E. Canis*. Waner y Harrus (1997), afirman que la trombocitopenia se debe a varios mecanismos: en la fase aguda a la destrucción, debido a cambios en el endotelio de los vasos sanguíneos y el secuestro esplénico de trombocitos.

Igualmente Smith et al (1975); Kakoma et al (1978) y Pierce et al (1977) afirman que la trombocitopenia se debe a la destrucción inmunológica y la disminución significativa de la vida media de estas células. Se reporta que en caninos con Ehrlichiosis existe una citoquina sérica llamada factor de inhibición de la migración plaquetaria

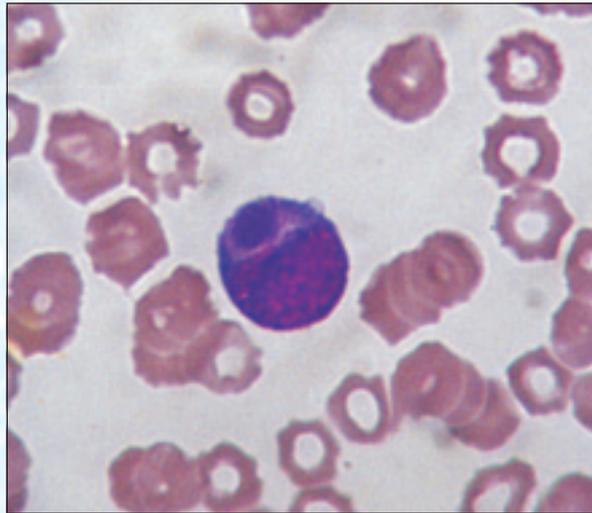


Figura 1. Frotis sanguíneo con parásito *Ehrlichia canis* dentro del citoplasma de un linfocito, Tinción de wright, aumento 100X.

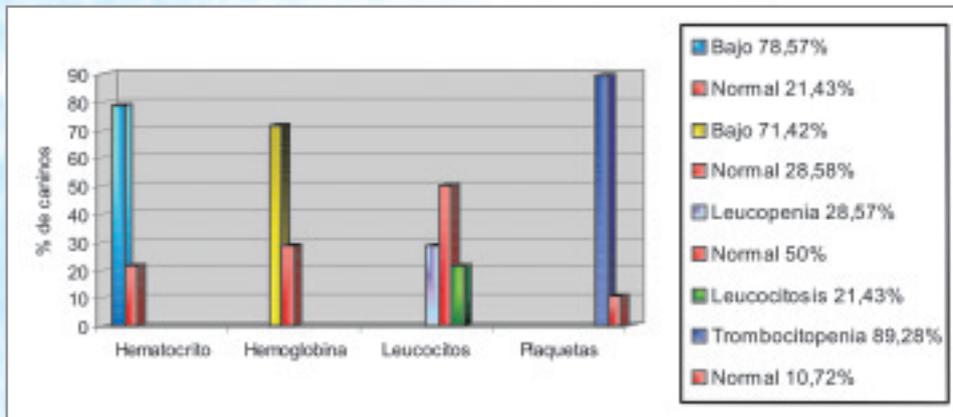


Figura 2. Porcentaje de animales con sintomatología de *E. Canis* y su variación en los valores del hemograma.

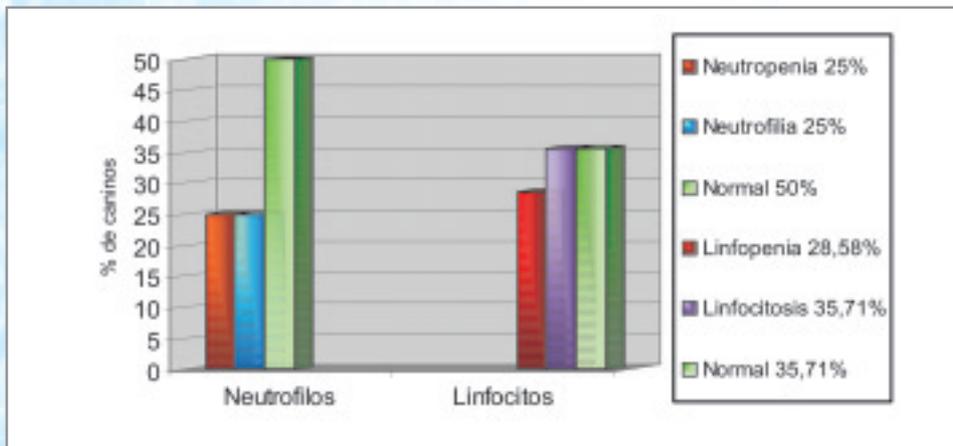
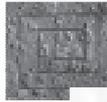


Figura 3. Porcentaje de animales con sintomatología de *E. Canis* y su variación en el recuento diferencial de Leucocitos.



FIMP que fue aislado y caracterizado y posiblemente juega un papel importante en el secuestro y estasis plaquetario, el FIMP impide la migración de estos elementos y es elaborado por linfocitos cuando se exponen a monocitos infectados (Abeygunawardena et al 1990). La demostración en suero sanguíneo de anticuerpos antiplaquetarios (APA) en perros después de la infección con *Ehrlichia canis*, apoya la teoría de la destrucción inmune en la fase aguda (Waner et al 1995; Waner et al 2000).

En la fase crónica severa de la enfermedad, la disminución de la producción plaquetaria debido a la

hipoplasia de la médula ósea es una de las razones más importantes de la trombocitopenia (Woody and Hoskins, 1991).

Los resultados hematológicos que hacen referencia al recuento diferencial no presentaron diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre los animales experimentales y los controles, debido a la gran variación en los datos obtenidos de los caninos con sintomatología de la enfermedad, en quienes los resultados variaron de bajos a normales y altos. De lo anterior concluimos que estadísticamente no hay diferencia significativa entre animales con sintomatología y los controles

negativos, indicándonos que el hemograma no es una orientación confiable para el diagnóstico de Ehrlichiosis; sin embargo hubo diferencias biológicas en los resultados de la media del hematocrito, hemoglobina, leucocitos y trombocitos, indicando que los animales con sintomatología de la enfermedad tienden a variar respecto a los valores normales. (Figura 3).

En el recuento diferencial se encontró que el 25% presenta neutropenia, 25% neutrofilia y el 50% valores considerados dentro de los rangos normales; estos resultados no pueden considerarse como estándar para el diagnóstico, debido

a la variación que ocurre durante el transcurso de la enfermedad, igual comportamiento se presenta con el porcentaje de linfocitos

Aunque no era objetivo del trabajo se encontró que las razas mayormente afectadas son el pastor alemán (17.9%) y labrador (14.3%). Las edades oscilaron entre 7 meses a 10 años con mayor presentación de casos en pacientes con edades entre 2 y 4 años (42.8%).

De los 30 caninos incluidos en el estudio 15 fueron machos y 15 hembras, correspondiendo el 50% a cada género.

CONCLUSIONES

La identificación de la mórula de *Ehrlichia canis* en frotis sanguíneo es un diagnóstico definitivo que no requiere confirmación por prueba serológica; sin embargo la no observación del parásito en el frotis no descarta la presencia de la enfermedad.

La observación de *Ehrlichia canis* en frotis sanguíneo es posible durante la fase aguda de la enfermedad; no obstante frotis de concen-

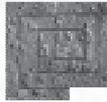
trados de la capa de células blancas aumenta la probabilidad de encontrar el parásito tanto en la fase aguda como en la crónica.

No se halló diferencia estadística significativa en las variables del hemograma al correlacionar pacientes positivos al frotis con pacientes positivos a la prueba de ELISA en los cuales no se encontró el parásito, indicando que el hemograma es una herramienta

diagnóstica que debe evaluarse con cuidado y esto hace necesario utilizar pruebas diagnósticas confirmativas como la prueba que permitió una aproximación confiable del diagnóstico de Ehrlichiosis.

La implementación de un método diagnóstico rápido como la prueba de ELISA que determina la presencia de anticuerpos en cualquiera de las fases de la enfermedad, es de mayor

confiabilidad y fácil adquisición, debe hacerse en pacientes en los que no se puede confirmar la enfermedad por la presencia del parásito, lo que representa para el médico veterinario un apoyo importante, que sumados a la historia clínica, análisis de signos clínicos y hallazgos de laboratorio, permiten hacer un diagnóstico más preciso y por consiguiente la instauración de un tratamiento eficaz.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYGUNAWARDENA I, KAKOMA I. And SMITH. 1990. Pathophysiology of canine ehrlichiosis, *Vet. Med Anim Science*, 54; 78 –92.
- ANDEREG P, and PASSOS I. 1999. Canine ehrlichiosis, *Clin. Vet.* 19: 31 – 38.
- BANETH G, WANER T, KOPLAH A, WEINSTEIN S, AND KEYSARY A. 1996. Survey of *E. canis* antibodies among dogs in Israel, *Vet. Rec.* 138: 257 – 259.
- DUQUE C y MORENO E. 1998. Prevalencia de *Ehrlichia canis* en Cundinamarca. Tesis para optar el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de la Salle.
- GREGORYC and FORRESTER S. 1990. *Ehrlichia canis*, *E. Equi*, *E. risticii*. In: GREENE C. Enfermedades infecciosas de perros y gatos. Philadelphia: W.B. Saunders: 404-414.
- HIBLER S C, HOSKINS J and GREENE E. 1986. Rickettsial infections in dog, Ehrlichiosis and infections cyclic thrombocytopenia. *Compend Conti Educ, Pract Vet.* 8: 106.
- HOSKINS J. 1991. Ehrlichia diseases of dogs: diagnosis and treatment. *Canine Pract.* 16: 13-21.
- IQBAL Z, CHAICHANA-SIRIWITHAYA W and RIKIHISA Y. 1994. Comparison of PCR other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 32: 1658-1662.
- KAKOMA I, CARSON C, RISTIC M, STEPHENSON E, HILDEBRANT R and HUXOLL D. 1978. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infect Immun.* 20: 242-247.
- KAKOMA I, HANSEN RD, ANDERSON BE, HANLEY T, SIMS KG, LIU L, BELLAMY C, LONG MT and BAEK BK. 1994. Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agente for atypical canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 32: 170-175.
- MAXINE N. BENJAMIN. 1984. Manual de Patología Clínica Veterinaria, Edit. Limusa, p.p. 34-45.
- PIERCE K, MARRS G and HIGTOWER D. 1997. Acute canine Ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *Am J Vet Res.* 38: 1821-1825.
- SMITH R, SELLS D, STEPHENSON E, RISTIC M and HUXOLL D. 1975. Development of Ehrlichia, causative agent of canine Ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus san-guineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. *Am J Vet Res.* 37: 119-126.
- WANER T and HARRUS S, WEISS D, BARK H, BOGIN E, AVIDAR T and KEYSARY A. 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Inmunopathol*, 48: 177-282.
- WANER T and HARRUS S. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis, In: Recent advances in canine diseases infectius. Carmichael (Ed). New York. 236-247.
- WANER T, STRENGER C and KEYSARY A. 2000. Comparison of clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of Ehrlichia canis antibodies in dogs. *J. Vet. Diagn Invest.* 12: 240-244.
- WANER T, STRENGER C and KEYSARY A. 2000. Comparison of clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of Ehrlichia canis antibodies in dogs. *J Vet Diagn Invest.* 12: 240-244.
- WANER T, HARRUS S, JONGEJAN F, BARK H, KEYSARY A and CORNELISSEN A. 2001. Significance of serological testing for ehrlichial disease in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol.* 95: 1-15.
- WEN B, RIKIHISA Y, MOTT J, GREENE R, KIM H, ZHI N, COUTO G, UNVER A and BARTSCH R. 1997. Comparison of nested PCR with immuno-fluorecent-antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol.* 35: 1952-1955.
- WOODY B and HOSKINS J. 1991. Ehrlichial disease of the dog. *Vet Clin Nort Am: Small Animal Practice.* 21: 45-98.