

## Diagnóstico de *Ehrlichia canis* en perros domiciliados de La Habana, Cuba



### Diagnosis of *Ehrlichia canis* in domestic dogs of Havana, Cuba

<http://opn.to/a/qKBuc>

Maylín González Navarrete <sup>1\*</sup>, Claudia Bezerra Da Silva <sup>2</sup>, Sandra Cuello Portal <sup>3</sup>,  
María Beatriz Rodríguez Alonso <sup>1</sup>, Adivaldo Henrique Da Fonseca <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Prevención, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de La Habana (UNAH), Carretera a Tapaste y Autopista Nacional, Km23 1/2, CP 32700, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 10 7,5 CEP 23891-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad multisistémica, de sintomatología compleja y signos clínicos inespecíficos que afecta a los perros domésticos. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la presencia de *Ehrlichia canis* en perros domiciliados, aparentemente sanos, de cuatro municipios del occidente de Cuba, mediante la visualización de frotis sanguíneo y de capa flogística. Se estudiaron 253 perros, de diferentes razas, edad y sexo de cuatro municipios de las provincias La Habana (Habana del Este, Boyeros y Cotorro) y Mayabeque (San José de las Lajas). Se realizaron 152 frotis de sangre venosa y 101 de capa flogística. Se visualizaron mórulas compatibles con *E. canis* en 6/152 (3,94 %) frotis de sangre venosa y en 8/101 (7,9 %) de los frotis de capa flogística, sin diferencias significativas entre los resultados. Se visualizó mórula compatible con *Anaplasma platys* en plaquetas en un frotis de sangre venosa, donde en un monocito también se observó mórula compatible con *E. canis*. Los resultados demostraron la presencia de mórula intracitoplasmática de *E. canis* en monocitos y de coinfección con *A. platys* en perros domiciliados aparentemente sanos.

**Palabras clave:** *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, frotis de sangre venosa, frotis de capa flogística, coinfección.

**ABSTRACT:** Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a multisystemic disease with complex symptoms and nonspecific clinical signs that affects domestic dogs. The aim of this work was to study the presence of *Ehrlichia canis* in apparently healthy domestic dogs from four municipalities in western Cuba, by visualizing blood smears and phlogistic layer smears. Two hundred fifty-three dogs of different breeds, ages and sexes were studied. They came from four municipalities in western Cuba in Havana (East Havana, Boyeros and Cotorro), and Mayabeque (San José de las Lajas) provinces. One hundred and fifty-two venous blood smears and 101 phlogistic layer smears were performed. Morulas compatible with *E. canis* were visualized in 6/152 (3.94 %) venous blood smears and in 8/101 (7.9 %) phlogistic layer smears, without significant differences among the results. Morula compatible with *Anaplasma platys* was visualized in platelets in a venous blood smear, where morula compatible with *E. canis* was also observed in a monocyte. The results obtained in this study demonstrated the presence of intracytoplasmic morula of *E. canis* in monocytes, having coinfection with *A. platys* in apparently healthy domestic dogs.

**Key words:** *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, venous blood smear, phlogistic layer smear, coinfection.

\*Autor para correspondencia: Maylín González Navarrete: E-mail: [mailyngo@unaha.edu.cu](mailto:mailyngo@unaha.edu.cu)

Recibido: 16/11/2018

Aceptado: 13/03/2019

## INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad multisistémica, de sintomatología compleja y signos clínicos muy inespecíficos, que afecta a los perros domésticos (1,2,3). Es producida por la bacteria *Ehrlichia canis*, rickettsia intracelular obligada, altamente pleomórfica, Gram negativa, que infecta monocitos y macrófagos. Se transmite por garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, especie más común que infesta a los perros (4).

Para el diagnóstico de este patógeno se utilizan diferentes técnicas, como los frotis de sangre y de capa leucocitaria, debido a que este microorganismo se caracteriza por la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (mórulas) en células mononucleares (monocitos) y ensayos serológicos y de PCR (5,6).

Debido al potencial zoonótico que posee esta rickettsia, a nivel mundial se han incrementado las investigaciones con el objetivo de determinar el impacto que esta tiene sobre la salud humana y animal. En Cuba, los estudios que se reportan son limitados y se orientan hacia el diagnóstico de la enfermedad en perros con sospecha clínica de ehrlichiosis (7,8), lo que indica que cuando el animal permanece asintomático se obvia la etapa subclínica. León *et al.* (8) lograron visualizar *E. canis* en frotis de sangre, de perros de la raza Pastor Alemán, con signos clínicos compatibles con la enfermedad y con antecedentes de infestación por garrapatas.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la presencia de *E. canis* en perros domiciliados, aparentemente sanos, de cuatro municipios del occidente del país, mediante la visualización de frotis sanguíneo y de capa flogística.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó entre septiembre de 2013 y agosto de 2014. Se estudiaron 253 perros domiciliados, aparentemente sanos, de diferentes raza, edad y sexo, de cuatro municipios del occidente de Cuba de las provincias La Habana (Habana del Este, Boyeros y Cotorro) y Mayabeque (San José de las Lajas).

A cada uno de los perros se les extrajo 3 mL de sangre venosa, mediante punción de la vena

cefálica, con agujas hipodérmicas calibre 21G en tubos para extracción de sangre por sistema de vacío de 4 mL (BD Vacutainer®) con 7,2 mg de EDTA como anticoagulante. Las muestras de sangre se trasladaron al laboratorio inmediatamente y se dividieron para su evaluación por frotis de sangre venosa (152 muestras) y de capa flogística (101 muestras).

Para obtener la capa flogística se llenaron los capilares de sangre venosa y se centrifugaron a 12000 rpm en microcentrífuga (Jouan, Inglaterra) durante 10 min. Posteriormente, se eliminó el extremo del capilar donde se encontraba el paquete de glóbulos rojos; el contenido de la capa flogística se depositó en una lámina portaobjeto y se extendió, según lo descrito por el Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal para Animales Terrestres (9).

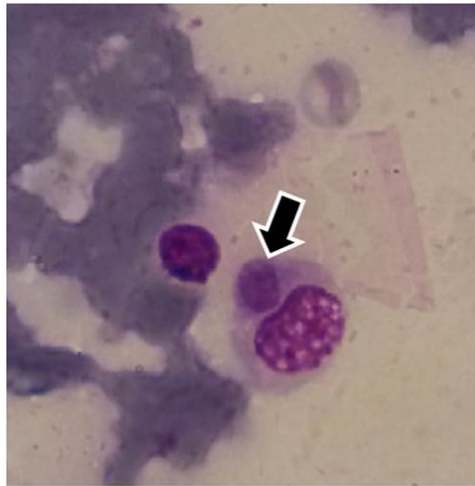
Ambos frotis se secaron a temperatura ambiente, se fijaron con Metanol absoluto (Uni-Chem) y se tiñeron durante 30 min con solución de Giemsa al 10 % (10). La observación se realizó en un microscopio óptico (Leica DM750, Inglaterra) con objetivo de inmersión 100X y ocular 10X. Se analizaron 20 campos por lámina como mínimo en la periferia del frotis (cola del frotis sanguíneo).

Los resultados de ambos frotis sanguíneos se compararon por el método Wald por corrección, con el programa CompaProWin 2.0.1 (11).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se visualizaron mórulas compatibles con *E. canis* (Fig. 1) en 6/152 (3,94 %) frotis de sangre venosa, de acuerdo con las características morfológicas previamente descritas por Nyindo *et al.* (12) y Tesouro y Sainz (13), como la forma, la localización y el tamaño. A pesar de que el diagnóstico se realizó en animales aparentemente sanos, los resultados sugieren que los animales donde se visualizaron las mórulas se encontraban en la fase aguda de la enfermedad donde, en ocasiones, los síntomas pueden ser inespecíficos, variables, e incluso pasar desapercibidos, y los animales no ser diagnosticados clínicamente (1).

Algunos de los perros diagnosticados como negativos por frotis sanguíneo pudieran encontrarse cursando la fase subclínica de la enfermedad, donde los animales no manifiestan signos clínicos (14). La expresión y la severidad



**Figura 1.** Mórula compatible con *E. canis* en monocito de un perro domiciliado, visualizada en frotis de sangre teñido con Giemsa, mediante microscopía óptica (1000X)./ *Morula compatible with E. canis in a monocyte of a domestic dog, visualized in blood smears stained with Giemsa by optical microscopy (1000X).*

de estos síntomas clínicos dependerán de la patogenicidad de *E. canis*, de los niveles de la rickettsemia y de la presencia de coinfecciones (15,16).

Los resultados coinciden con los obtenidos por Woody y Hoskins (17), quienes reportaron un bajo porcentaje de animales positivos en los frotis sanguíneos (4 %), debido a que en la fase aguda de la enfermedad se produce una baja y fluctuante rickettsemia, que disminuye aún más en las fases subclínica y crónica, lo que propicia la aparición de falsos negativos.

En un estudio aleatorio realizado en perros domiciliados del estado de Salvador de Bahía, en Brasil, se reportó una baja frecuencia de animales positivos a *E. canis* por frotis sanguíneo, lo que pudo ser explicado porque los animales se encontraban en la fase subclínica o crónica de la enfermedad (18).

En investigaciones realizadas en perros atendidos en clínicas veterinarias de diferentes estados de Brasil, se mostraron también bajos porcentajes de detección de *E. canis* en monocitos (19,20,21). Sin embargo, a pesar de que estos animales mostraban signos clínicos compatibles con la EMC, los porcentajes de animales positivos por frotis sanguíneo fueron inferiores a los obtenidos en el presente estudio, lo que demuestra la variabilidad en la presentación y manifestación de los síntomas clínicos y su relación con los resultados del diagnóstico (1).

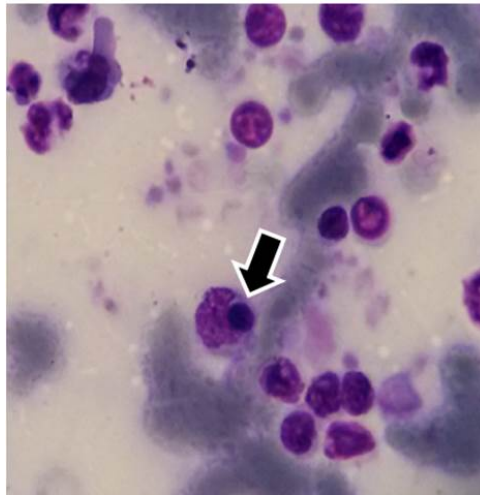
En el frotis de capa flogística existen mayores probabilidades de visualizar mórulas de *E. canis* en monocitos, debido a la concentración de las células de la serie blanca. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de ambos frotis y solo se visualizaron mórulas compatibles con *E. canis* en 8/101 (7,9 %) frotis de capa flogística, lo que igualmente sugiere que estos animales se encontraban en la fase aguda de la enfermedad, a pesar de que no mostraban signos clínicos (Fig. 2).

Resultados inferiores se reportaron por Faria *et al.* (22); estos autores diagnosticaron 5,7 % perros positivos a *E. canis* con signos clínicos compatibles con la enfermedad. Sin embargo, los resultados son diferentes cuando se compara el diagnóstico directo para *E. canis* en capa leucocitaria con el realizado en otras muestras, como ganglios linfáticos y médula ósea (5).

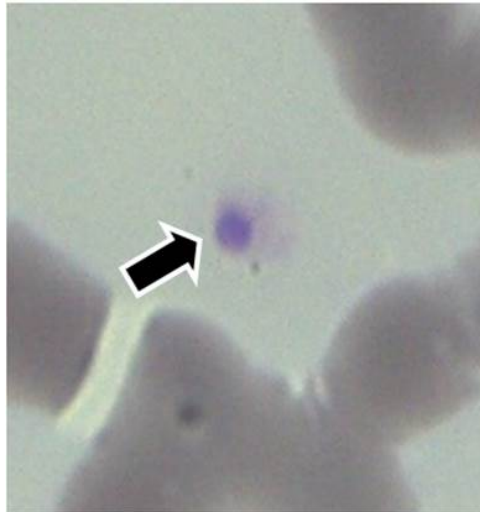
En un frotis de sangre venosa, donde se observó mórula compatible con *E. canis* en monocito, también se visualizó mórula compatible con *A. platys* en plaquetas (Fig. 3), para una frecuencia de coinfección de 0,66 %.

*A. platys* se reportó en Cuba por Silva *et al.* (23) mediante PCR anidada, en 16 % de muestras de sangre procedentes de perros domiciliados aparentemente sanos.

La coinfección de *E. canis* y *A. platys* encontrada en el presente estudio se puede deber a que la garrapata *R. sanguineus* es el principal



**Figura 2.** Mórula compatible con *E. canis* en monocito de un perro domiciliado, visualizada en frotis de capa leucocitaria teñido con Giemsa, mediante microscopía óptica (1000X)./ *Morula compatible with E. canis in a monocyte of a domestic dog, visualized in leukocyte layer smears stained with Giemsa by optical microscopy (1000X).*



**Figura 3.** Corpúsculo de inclusión compatible con *Anaplasma platys* en plaquetas de un perro domiciliado, visualizada en frotis de sangre teñido con Giemsa, mediante microscopía óptica (1000X)./ *Inclusion corpuscle compatible with Anaplasma platys in platelets of a domestic dog, visualized in blood smears stained with Giemsa by optical microscopy (1000X).*

vector de estos agentes (24,25), y en esta garrapata también se ha descrito la presencia de ambos patógenos (26).

Varios autores reportan en perros domiciliados, aparentemente sanos y perros con signos clínicos compatibles con hemoparasitosis, la detección de coinfecciones por PCR anidada entre *E. canis* y otros hemoparásitos, entre las que se encuentran: *E. canis* con *A. platys* (16,09 %) y *E. canis* con *A. platys* y *B. canis* (1,95 %) (27); *E. canis* con *A. platys* y *B. canis vogeli* y *E. canis* con *A. platys* y *H. canis* (28). Estos autores también detectaron coinfección entre *E. canis* y *B. gibsoni* en garrapatas *R. sanguineus* s.l.

En perros de la India también se encontró que el 11,5 % de perros de refugio, de dos ciudades con clima tropical y subtropical húmedo, estaban coinfectados (29).

Los resultados del presente estudio demostraron la presencia de mórula intracitoplasmática de *E. canis* en monocitos y de coinfecciones con *A. platys* en perros domiciliados aparentemente sanos. Estos resultados constituyen la premisa de posteriores investigaciones para estimar la prevalencia del patógeno en estas poblaciones de perros, dado el potencial zoonótico de este hemoparásito y la

necesidad de tomar medidas para su control con el enfoque de Una Salud.

## REFERENCIAS

1. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). s.l.: An overview. Vet J. 2011;187:292-296.
2. Cardoso L, Mendão C, Madeira de Carvalho L. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp., *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. Parasite Vectors. 2012;5(62).
3. Peniche-Lara G, Perez-Osorio C, Dzul-Rosado K, Zavala-Castro JE. Rickettsiosis: Enfermedad re-emergente en México. Ciencias Humanas Salud. 2015;2:76-84.
4. Otranto D, Dantas-Torres F. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: Current situation and perspectives. Parasite Vectors . 2010;3(2).
5. Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Vet Microbiol. 2003;91:197-204.
6. Rotondano TEF, Almeida AMP, Lustosa EMC, Cordeiro AA, Camboim EKA, Azevedo SS, et al. An assessment of whole blood and fraction by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. The Scientific World Journal. 2012, Article ID 605743, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/605743>.
7. Pérez B, Valdés R, Vitorte S. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas en Cuba. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias. 2002;20:78-87.
8. León A, Demedio J, Márquez M, Castillo E, Perera A, Zuaznaba O, et al. Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de La Habana.: REDVET. 2008,3(5). Mayo. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050508.html1-22>
9. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.5.15. -Tripanosomiasis (*Trypanosoma evansi*). 2004;815:825.
10. Schalm OW. Hematología Veterinaria. Edit UTEHA. México.1964.
11. Castillo Y, Miranda I. NOTA TÉCNICA. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. Rev Protección Vegetal. 2014;29(3):231-234.
12. Nyindo MM, Huxsoll DL, Smith AR. Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent - *Ehrlichia canis*. Am J Vet Res. 1971;32(11):1651-1658.
13. Tesouro-Díez MA, Sainz-Rodríguez A. Ehrlichiosis monografías: Canis y Felis. 2001;6(51):1-65.
14. de Caprariis D, Dantas-Torres G, Capelli G, Mencke N, Stanneck D, Breitschwerdt EB, et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. Vet Microbiol . 2011;149(1-2):206-212.
15. Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AWCA. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1999; 37(9):2745-2749.
16. Vieira RFC, Biondo AW, Guimarães AMS, Santos AP, Santos RP, Dutra LH, Diniz PP. Ehrlichiosis in Brazil. Rev Bras Parasitol V. 2011;20:1-12.
17. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. Veterinary Clinical North American Small Animal Practice. 1991;21(1):75-98.
18. Guedes PEB, Oliveira TNA, Carvalho FS, Santiago RAC, Albuquerque GR, Munhoz AD, et al. *Canine ehrlichiosis*: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. Brazilian J. Vet Parasitol 2015;24(2):115-121.
19. Tanikawa A, Labruna M, Costa A, Aguiar D, Justiniano S, Mendes R, et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. Res Vet Sci. 2013;94:474-477.
20. Rotondano F, Karyanne H, Almeida A, da Silva F, Lira V, Fernandes I, et al. Survey of

- Ehrlichia canis, Babesia spp. and Hepatozoon spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. Brazilian J Vet Parasitol. 2015;24(1):52-58.
21. Sales MR, Ignacchiti DM, Mendes AF, Suhett WG, Porfírio L, Marins M, *et al.* Prevalência de *Ehrlichia canis* pela Nested-PCR, correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil. Rev Bras Parasitol V. 2015;37(1):47-51.
22. Faria JLM, Dagnone AS, Th Demarchi, Franchi C, Biscola W A, Zacarías R, Tinucci M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. Rev Bras Parasitol V. 2010;19(2):98-102.
23. Silva C, Azevedo H, González M, Dias CC, Corona B, Fuentes M, Sandes M. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba. Ticks Tick-borne Dis. 2016;7:938-944.
24. Tabar MD, Altet L, Martínez V, Roura X. *Wolbachia filariae* and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. J Small Animal Practice. 2013;54:174-178.
25. Rojas A, Rojas D, Montenegro V, Gutiérrez R, Yasur-Landau D, Baneth G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. Vet Parasitol. 2014;199:121-128.
26. Ybañez A, Perez P, Gabotero SR, Kotaro M, Inokuma H. First molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks from dogs in Cebu, Philippines. Ticks Tick-borne Dis. 2012;3:288-293.
27. Ramos R, Ramos C, Araújo F, Oliveira R, Souza I, Pimentel D, Galindo M. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). Parasitol Res. 2010;107:1115-1120.
28. Low VL, Prakash BK, Limnb YA, Tan TK, Vinnie-Siow WY, Sofian-Azirun M, AbuBakar S. Detection of Anaplasmataceae agents and co-infection with other tick-borne protozoa in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. Exp Appl Acarol. 2018;75(4):429-435.
29. Abd Rani P, Irwin PJ, Coleman GT, Gatne M, Traub R. A survey of canine tick-borne diseases in India. Parasite Vectors . 2011;4:141-148

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)