

Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica

Evaluation of the diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs from Costa Rica, using blood smears and molecular technique

Luis Ernesto Romero Pérez¹ ; Gaby Dolz Wiedner²; Juan José Romero Zúñiga²; Ana Meneses Guevara³; Mauricio Jiménez Soto⁴ y Lizbeth Salazar Sánchez⁵.

¹ Laboratorio de Diagnóstico y Control de Calidad. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). San Salvador, El Salvador. E-mail: luisromerovet@gmail.com

² Programa de Investigación en Medicina Poblacional. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. E-mail: gabyd@una.cr / E-mail: juan.romero.zuniga@una.cr

³ Laboratorio de Análisis Clínico. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. E-mail: anag.meneses@gmail.com


⁴ Hospital Especies Menores y Silvestres. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. E-mail: mjimenez@una.cr

⁵ Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines. Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica. E-mail: lizbeth.salazar@gmail.com

Recibido: 12 Abril, 2012. Corregido: 14 Febrero, 2013. Aceptado: 22 Marzo, 2013.

Resumen. El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados del diagnóstico de *Ehrlichia canis*, mediante frotis sanguíneo y técnica de reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) en sangre de perros del Valle Central de Costa Rica. Para este fin, se utilizaron 300 muestras sanguíneas de caninos sospechosos de sufrir ehrliquiosis; estas muestras habían sido remitidas de diferentes clínicas veterinarias; también, habían sido analizadas, previamente, mediante frotis sanguíneo, PCR anidado, y en algunos casos, mediante técnica serológica. De cada muestra de sangre se obtuvo, además, información sobre: localización geográfica de la clínica veterinaria, datos del perro al que pertenecía la muestra sanguínea como: raza, edad, sexo y signos clínicos que presentó el perro.

Del total de 300 muestras analizadas, en 147 (49,0%) hubo resultados positivos a *E. canis*, utilizando un PCR anidado; mientras que, en 178 (59,3%) fueron reportadas con inclusiones

 Autor para correspondencia
Ministerio de Agricultura y Ganadería,
Cantón El Matazano, Soyapango,
San Salvador, El Salvador
Correo electrónico: luisromerovet@gmail.com



mediante la técnica de frotis sanguíneo. Solamente, en 103 (57,9%) de los casos positivos, en frotis sanguíneo, fue posible el diagnóstico molecular de *E. canis*; mientras que de las 122 muestras reportadas negativas (sin inclusiones) un 36,0% (44) de los casos resultaron positivas en la técnica de PCR. Para la prueba de frotis sanguíneo se determinó una sensibilidad del 70,1% y una especificidad del 51,0%, valor predictivo positivo de 57,9% y valor predictivo negativo de 63,9%, comparado con la técnica de PCR. El análisis de regresión logística reveló asociación positiva ($p < 0,05$) con la presencia de inclusiones, pero no con la edad o el sexo del animal; mientras que, la aplicación de la prueba t-student detectó diferencias altamente significativas en los promedios de las variables de hematocrito y hemoglobina entre perros PCR positivos y perros PCR negativos a *E. canis*. De las 30 muestras evaluadas, previamente, mediante serología, un 25,0% de los casos seropositivos y un 36,4% de los casos seronegativos resultaron positivos en el diagnóstico molecular de *E. canis*. El hallazgo de valores bajos de hematocrito y hemoglobina, en combinación con signos clínicos y la detección de inclusiones en muestras sanguíneas, representan un fuerte indicio de infección con ehrlichiosis; sin embargo, es necesaria la aplicación de una técnica molecular como método diagnóstico confirmativo.

Palabras claves: Ehrlichia canis; frotis sanguíneo; PCR; perros; Costa Rica.

Abstract. The objective of this study was to compare the results of the diagnosis of Ehrlichia canis in blood of dogs from the Central Valley of Costa Rica, using blood smears and the polymerase chain reaction (PCR). For this purpose, 300 blood samples of dogs suspected of suffering ehrlichiosis were used. Samples were obtained from different veterinary clinics and had been previously analyzed using blood smears, nested PCR, and, in some cases, the serological technique. In addition, the following information was obtained from each blood sample: geographical location of the veterinary clinic and data from the dog such as race, age, sex, and clinical signs. Of the total 300 samples analyzed, 147 (49.0%) were positive for E. canis, using a nested PCR, while 178 (59.3%) were reported with inclusions using blood smears. However, only 103 (57.9%) of the positive cases using blood smear resulted in the molecular diagnosis of E. canis; while of the 122 negative samples (no inclusions) 44 (36.0%) were positive using the PCR technique. Blood smear testing showed a sensitivity of 70.1% and a specificity of 51.0%; positive and negative predictive values were 57.9% of 63.9%, respectively, compared with the PCR technique. The logistic regression analysis showed a positive association ($p < 0.05$) with the presence of inclusions, but not for age or sex, while highly significant differences were detected using the Student's T-Test in the average hematocrit and hemoglobin variables between PCR positive and PCR negative dogs. Of the 30 samples previously evaluated by serological tests, 25.0% of seropositive cases and 36.4% of seronegative cases were positive in the molecular diagnosis of E. canis. Low levels of hematocrit and hemoglobin, together with clinical signs and inclusions detected in blood samples, represent a strong indication of ehrlichiosis infection. However, a molecular technique is required to confirm the diagnosis.

Keywords. Ehrlichia canis, blood smear, PCR, dogs, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La ehrliquiosis es una enfermedad transmitida por garrapatas, ampliamente diseminada alrededor del mundo, siendo *Ehrlichia canis*, una bacteria intracelular obligada, el agente principal asociado a enfermedad en caninos (Breitschwerdt et al., 1998; Dumler et al., 2001). Clínicamente, la ehrliquiosis puede cursar con 3 fases: aguda, subclínica y crónica. La primera fase ocurre posterior al período de incubación (8-20 días) y aquí los signos remiten, usualmente, en 15 días, pudiendo existir una recuperación total o inducir a una fase subclínica, en la cual no es posible observar signos evidentes, a pesar de que el agente persiste dentro del hospedero. Una tercera fase, la crónica, puede seguir a la fase subclínica, y es muy difícil la recuperación del paciente en esta fase. Las causas que conllevan al desarrollo de la fase crónica de la ehrliquiosis son desconocidas; sin embargo, se ha determinado que el agente puede mantenerse en un animal durante años sin desarrollar enfermedad (Harrus et al., 1998a).

De acuerdo con estudios realizados en Israel, el animal representa una potencial fuente de infección, no sólo en la fase aguda de la enfermedad, sino también en la fase subclínica, pudiendo transmitir el agente a las garrapatas (Harrus et al., 1998a). Los síntomas de la ehrliquiosis varían, dependiendo de la fase en que se encuentre el paciente (Waner & Harrus, 2000); los más frecuentes son: fiebre alta, anorexia, emaciación, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, alteraciones respiratorias, cardíacas, nerviosas y oculares; así como alteraciones hematológicas que incluyen, entre otros, anemia, leucopenia y trombocitopenia (Meneses, 1995; Castro et al., 2004).

Cuando *E. canis* ingresa al torrente sanguíneo y linfático, por la mordida de una garrapata infectada, se multiplica en los leucocitos y macrófagos del bazo, hígado y ganglios linfáticos, donde se replica por fisión binaria, para luego diseminarse hacia otros órganos del cuerpo. Existen estudios que han intentado explicar la patogénesis de *E. canis*. Los estudios realizados por Castro et al. (2004) demuestran una participación exagerada de células inmunes, sobre todo en linfonodos y bazo, de animales infectados, y una respuesta inmune humoral predominante de tipo IgG2. Estas inmunoglobulinas pueden activar complemento, y así participar en reacciones de hipersensibilidad de tipo III, mecanismo que puede tener importancia en la vasculitis observada en la ehrliquiosis canina. Esta vasculitis inmunomediada juega un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad y podría explicar la mayoría de las lesiones observadas en órganos y tejidos de perros infectados (Harrus et al., 1999; Castro et al., 2004). Posterior a la infección, se observa un aumento de temperatura, quizá por incremento de interleucina 1 producido por células presentadoras de antígeno y células B o por productos pirógenos exógenos de la bacteria (Castro et al. 2004).

Las alteraciones hematológicas observadas varían de acuerdo con la fase de la enfermedad y están asociadas a una supresión de la médula ósea (Harrus et al., 1999). Las alteraciones bioquímicas incluyen, por una parte, hipergammaglobulinemia, la cual no se correlaciona únicamente con la producción de anticuerpos específicos, sugiriendo una estimulación inespecífica de la respuesta inmune, y por la otra, hipoalbuminemia y edema



por aumento de la permeabilidad vascular, pérdida de sangre y glomerulopatía (Harrus et al., 1999).

Se cree que un posible mecanismo, mediante el cual *E. canis* sobrevive dentro de la célula, es inhibiendo la fusión fagosoma-lisosoma, efecto que es restaurado tras la administración de doxiciclina. También, existen otras drogas de comprobada eficacia como: tetraciclina, oxitetraciclina, minociclina y cloranfenicol (Waner & Harrus, 2000).

En la mayoría de los casos, los perros, en fase aguda de la enfermedad, responden al tratamiento con doxiciclina dentro de 24 a 72 horas posteriores a la primera administración. El protocolo recomendado es de 10mg/kg una vez al día por 28 días (Neer et al., 2002); sin embargo, Harrus et al. (2004) encontraron que, este tratamiento elimina el agente en 16 días. Por otra parte, el tratamiento para animales que se encuentran en la fase subclínica y crónica de la enfermedad debe ser aún evaluado; dado que, perros infectados en forma subclínica pueden permanecer portadores aún después de seis semanas de tratamiento con doxiciclina (Harrus et al., 1998b) y solamente existe un reporte de tratamiento exitoso con recuperación de la fase crónica de la enfermedad (Waner & Harrus, 2000).

El único método profiláctico existente es el control del vector. En algunos lugares endémicos se administran bajas dosis de oxitetraciclina como método preventivo, con muy buenos resultados; sin embargo, no se puede descartar que esta práctica conlleve al desarrollo de cepas resistentes a la droga (Waner & Harrus, 2000).

Para el diagnóstico de la ehrliquiosis se emplean diversas técnicas laboratoriales como: la identificación de cuerpos de inclusión en frotis sanguíneos, el aislamiento del agente mediante cultivo celular, la detección de anticuerpos y la detección de ADN mediante PCR y confirmación mediante secuenciación (Breitschwerdt et al., 1998; Waner & Harrus, 2000; Pérez et al., 2006).

La evaluación microscópica de cuerpos de inclusión, en frotis sanguíneos, resulta una técnica rápida, sencilla y económica; sin embargo, aproximadamente, solo en un 4% de los casos agudos es posible demostrar la mórula intracitoplasmática de *E. canis* (Waner & Harrus, 2000). En el caso del aislamiento *in vitro*, *E. canis* ha logrado cultivarse en la línea celular macrófago-monocítica canina DH82, derivada de un caso de histiocitosis maligna canina (Dawson et al., 1991). Desventajas importantes del aislamiento en cultivo celular son la necesidad de experiencia técnica y períodos prolongados de hasta 34 días para la obtención de resultados (Waner & Harrus, 2000), lo que convierte a esta técnica en un proceso costoso, laborioso e impráctico para el diagnóstico oportuno de la enfermedad. El cultivo celular; sin embargo, como la "prueba de oro" para el diagnóstico de ehrliquiosis (Felek et al., 2001). Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas en el diagnóstico de ehrliquiosis, debido a que son pruebas altamente sensibles; no obstante, presentan la desventaja de que únicamente evidencian un contacto con el agente, sin determinar la existencia de la enfermedad, o incluso la presencia o ausencia actual del agente en el animal (Murphy et al., 1998). Otra desventaja importante, en el diagnóstico serológico, es el alto grado de reacción cruzada existente entre *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* (Pérez et al., 1996; Liddell et al., 2003), que dificulta la diferenciación entre especies (Waner et al., 2001).

En relación con las técnicas moleculares, diversos estudios han demostrado la técnica de PCR como un método efectivo y sensible para la detección de *E. canis* (Ndip et al., 2005). La técnica de PCR convencional, basada en la amplificación de regiones del gen *16S ARNr* de *Ehrlichia*, ha demostrado efectividad en muestras de sangre de humanos y perros con un límite de detección de 20pg para ADN de *E. canis* extraído de células DH82 infectadas (Iqbal et al., 1994; Dawson et al., 1996), y se han obtenido aún mejores resultados utilizando una técnica de PCR tipo anidado, que incrementa la sensibilidad analítica de la prueba hasta 0,2 pg de ADN (Wen et al., 1997). Además, la técnica de PCR tipo anidado ofrece la ventaja de poder determinar las especies *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* utilizando el mismo producto de la primera reacción. Esta técnica de PCR anidado ha demostrado ser útil para el diagnóstico de ehrliquiosis en distintas partes del mundo (Harrus et al., 1998a; Murphy et al., 1998; Aguirre et al., 2004; Hori-Oshima et al., 2006), ya sea para diagnosticar los agentes en muestras de humanos, animales domésticos y silvestres, como en garrapatas (Lockhart et al., 1997; Murphy et al., 1998; Kocan et al., 2000). Otra ventaja es la capacidad de la prueba para detectar los agentes aún en la fase temprana de la enfermedad y en la fase subclínica, permitiendo identificar animales portadores, incluso cuando no se ha logrado establecer aún una respuesta inmune (Harrus et al., 1998a; Standaert et al., 2000), lo que permite iniciar el tratamiento, inclusive antes de la manifestación de signos clínicos.

E. canis posee una distribución que abarca el trópico y subtrópico de todo el mundo. En América existe evidencia serológica en: Costa Rica, Estados Unidos de América (EEUU), Chile y México (Meneses, 1995; Murphy et al., 1998; López et al., 1999; Rodríguez-Vivas et al., 2005); y evidencia molecular en: Costa Rica, Venezuela, EEUU, Brasil y México (Romero et al., 2011; Pérez et al., 1996; Breitschwerdt et al., 1998; Dagnone et al., 2003; Hori-Oshima et al., 2006), habiéndose detectado en Venezuela como agente infeccioso de humanos (Pérez et al., 1996; Pérez et al., 2006). El primer reporte de *E. canis* en Costa Rica fue realizado por Meneses (1995), mediante el uso de microscopía e inmunofluorescencia indirecta. Desde entonces este agente ha sido detectado, de forma rutinaria mediante pruebas inmunoenzimáticas, inmunofluorescentes o por presencia de inclusiones (cuerpos de inclusión o mórulas), en laboratorios clínicos y clínicas veterinarias de Costa Rica. Aunque no existen estudios de prevalencia en el país, una investigación realizada en la Universidad Nacional determinó un 70,0% de casos seropositivos en perros sospechosos de sufrir ehrliquiosis (Rímolo, 2006). Recientemente, Romero et al. (2011) reportaron el primer diagnóstico molecular, aislamiento y caracterización molecular de *E. canis* en Costa Rica.

Este estudio pretende comparar y evaluar la técnica microscópica de cuerpos de inclusión en frotis sanguíneos con la técnica molecular de PCR anidado para determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del frotis sanguíneo comparado con los resultados obtenidos en la técnica de PCR, así como determinar características de los animales y valores hematológicos asociadas a la presencia de *E. canis*.



MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 300 muestras de sangre canina fueron recolectadas, entre octubre 2006 y octubre 2007, en diversas clínicas veterinarias y laboratorios de análisis clínicos veterinarios del Valle Central, procedentes de perros con sospecha de sufrir ehrliquiosis, basado en el cuadro clínico que presentaban los animales y en el diagnóstico de inclusiones leucocitarias compatibles con *Ehrlichia* spp., con el fin de determinar la presencia de especies de *Ehrlichia* (Romero et al., 2011). La extracción de ADN de las muestras sanguíneas, y su amplificación mediante PCR anidado, se realizó como ha reportado Romero et al. (2011). En resumen, se realizó la extracción de ADN con Wizard Genomic Purification Kit (Promega). El ADN se sometió a un primer PCR para amplificar un segmento de 478–480 pb, correspondiente al gen 16S ARNr, utilizando los cebadores ECC y ECB, seguido del PCR especie-específico empleando los cebadores ECAN5 y HE3. Las reacciones comprendieron 12.5 µl de MasterMix (Fermentas®), 0.2 µM de cada cebador, 1µl de ADN y agua libre de nucleasas (Fermentas®) para completar una reacción de 25 µl. El protocolo empleado fue de 2 minutos iniciales de desnaturalización a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por un minuto, 60°C por un minuto y 72°C por un minuto, finalizando con 72°C por cinco minutos. Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE (pH 8), mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta, considerando positivas las muestras con un tamaño 389 pb.

Cada muestra se acompañó de una encuesta para recolectar información sobre ubicación geográfica de la clínica veterinaria de procedencia del perro, raza, sexo, edad y síntomas clínicos. Además, se recolectó información sobre el resultado del frotis sanguíneo, hemograma y examen serológico (Snap® 3Dx, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA), en caso de haber sido efectuado. La sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de los resultados obtenidos en el frotis sanguíneo (presencia de inclusiones) se determinó mediante el programa Win Episcopy 2.0, tomando como prueba de oro la técnica de PCR.

Se utilizó el modelo de regresión logística ordinaria para determinar asociación entre variables: edad, sexo, raza y presencia de inclusiones en frotis sanguíneos, con positividad en la técnica de PCR. Las variables hematológicas de animales positivos y negativos a PCR se compararon mediante la prueba de t-student. Ambas pruebas se realizaron mediante el programa SAS versión 6.0 (SAS Inst. Inc., USA, 1990).

RESULTADOS

Del total de 300 muestras sanguíneas analizadas, mediante la técnica de PCR, se detectó ADN de *E. canis* en 147 (49,0%) muestras (Romero et al., 2011); mientras que el análisis, mediante frotis sanguíneo, en búsqueda de inclusiones compatibles con *E. canis* arrojó 178 (59,3%) muestras con inclusiones. Solamente en 103 (57,9%) de las muestras con inclusiones fue posible detectar ADN de *E. canis*, mientras que en 44 (36,0%) de las muestras sin inclusiones también se detectó ADN de *E. canis* (Cuadro 1).

Para la prueba de frotis sanguíneo se determinó una sensibilidad del 70,1%; una especificidad del 51,0%; un valor predictivo positivo de 57,8% y valor predictivo negativo de 63,9%, comparado con los resultados obtenidos en la técnica de PCR. El análisis de regresión logística demostró, sin embargo, que animales con inclusiones reportadas en frotis sanguíneos tuvieron 2,6 veces el riesgo de ser positivos en la PCR de *E. canis* que muestras de perros que no presentaron inclusiones (OR= 2,6; IC_{95%} = 1,3-5,0; p < 0,01).

Cuadro 1. Comparación de resultados obtenidos mediante observación de inclusiones y PCR en 300 muestras caninas.

	PCR +	PCR -	Total
Inclusiones +	103	75	178
Inclusiones -	44	78	122
Total	147	153	300

De las 30 muestras evaluadas previamente mediante serología, un 25,0% de los casos seropositivos (2/8) y un 36,4% de los casos seronegativos (8/22) resultaron positivos en el diagnóstico molecular de *E. canis*.

A pesar de contar con una encuesta para recolectar información básica de las muestras, no fue posible obtener información del total de las muestras procesadas; por lo cual, la descripción y el análisis de las variables se efectuaron con los datos disponibles.

La distribución geográfica, por provincia, de las 147 muestras positivas a *E. canis* mediante la técnica de PCR se muestra en el Cuadro 2. Un total de 44 muestras positivas (29,9%) fueron remitidas sin datos geográficos.

Cuadro 2. Distribución geográfica, por provincias del Valle Central, de las muestras caninas que resultaron positivas a *E. canis* en PCR.

Provincia	Total n= 300	Positivos n= 147	Porcentaje
San José	54	25	17,0%
Alajuela	101	55	37,4%
Heredia	55	23	15,7%
Cartago	0	0	0%
Sin datos geográficos	90	44	29,9%
TOTAL	300	147	100%

Con respecto a las características de los perros, en 181 de los casos se contó con datos de raza: 24 razas estuvieron representadas, las más comunes son: Schnauzer (7,7%), Cocker Spaniel (7,7%), Caniche (7,2%), Labrador Retriever (6,6%), Pastor Alemán (6,1%) y Golden

Retriever (4,4%); sin embargo, las muestras de animales sin raza definida (24,3%) fueron predominantes. Este grupo también representa el grupo con más animales positivos a *E. canis* (Cuadro 3). No fue posible realizar un análisis de regresión logística con la variable raza, debido a la poca cantidad de observaciones en cada estrato. En relación al sexo se contó con datos de 146 animales, de éstos 75 (51,4%) fueron hembras y 71 (48,6%) machos. La edad promedio de los 207 animales, de los cuales se contaba con este dato, fue de 4,9 años, oscilando entre 1 mes y los 15 años y un 49,55% de los casos positivos fueron de animales entre 1 y 5 años de edad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de raza, sexo y edad de los caninos analizados mediante PCR y caninos que resultaron positivos a *E. canis*.

Variable	Total analizados		Positivos <i>E. canis</i>	
Raza	n = 181		n = 92	
SRD*	44	24,3%	26	28,3%
Sexo	n = 146		n = 76	
Machos	71	48,6%	37	48,7%
Hembras	75	51,4%	39	51,3%
Edad	n = 207		n = 111	
1 año	30	14,5%	20	18,0%
1-5 años	102	49,3%	55	49,5%
>5 años	75	36,2%	36	32,5%

*SRD= Sin raza definida

El modelo de regresión logística no reveló asociación positiva ($p < 0,05$) con la edad o sexo de los animales.

La sintomatología reportada en las muestras caninas fue muy variable y solamente se obtuvo en 65 (21,7%) de los casos. Fiebre, depresión, anorexia, mucosas pálidas y pérdida de peso fueron los signos mayormente reportados, tanto en animales PCR positivos como PCR negativos. En los animales PCR positivos se reportó, además, sangrado nasal, infección ocular, dolor lumbar, petequias y vómito.

Se obtuvo valores hematológicos de 274 perros, de estos, el 56,6% presentó un recuento leucocitario dentro de los límites normales, mientras que en un 39,4% se determinó valores bajos de hematocrito y un 43,8% con valores de hemoglobina inferiores o iguales a 12 g/dl.

Cuando las muestras fueron separadas con base a resultados positivos y negativos obtenidos en la técnica de PCR, se observó que los promedios de hematocrito y hemoglobina fueron inferiores en las muestras positivas a *E. canis* que los rangos de referencia y con

respecto a las muestras negativas (Cuadro 4), mientras que no se encontró diferencia significativa en las demás variables hematológicas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de las variables hematológicas de caninos PCR positivos y PCR negativos a *E. canis* mediante la prueba de t-student.

Variable	Resultado al PCR		Diferencia entre grupos		P	
	Negativo	Positivo				
	n ₁	Promedio	n ₂	Promedio		
Hematocrito	139	38,6	138	33,3	5,236	<0,01
Hemoglobina	139	13,4	138	11,6	1,784	<0,01
CHCM ¹	138	34,9	138	35,1	0,2	0,46
Leucocitos	139	11568	136	10841	727,1	0,46

¹CHCM= Concentración de hemoglobina corpuscular media, P= probabilidad

DISCUSIÓN

E. canis había sido reportado, previamente, como causante de ehrliquiosis en perros de Costa Rica (Meneses, 1995). Recientemente, se logró detectar en un 47,7% de muestras sanguíneas de perros sospechosas de sufrir ehrliquiosis, mediante un PCR anidado, lográndose, además, el aislamiento de *E. canis* en cultivo celular y su caracterización molecular. No se pudo, sin embargo, detectar la presencia de ADN de *E. chaffeensis* y *E. ewingii* en ninguna de las muestras (Romero et al., 2011). La evaluación de la técnica de frotis sanguíneo mostró valores predictivos positivos y negativos muy bajos con respecto a la técnica de PCR. En 75 muestras (42% de los casos) con inclusiones no se logró confirmar la presencia de *Ehrlichia canis* mediante la técnica de PCR, lo cual se puede deber a la presentación de estructuras muy similares a las inclusiones producidas por *E. canis* en células sanguíneas, que en realidad son granulaciones azurófilas en linfocitos activos o la superposición de plaquetas sobre monocitos que pueden mimetizar las formas de mórulas (Eliás, 1991; Mylonakis et al., 2003) originando resultados falsos positivos.

Además, Weiser et al. (1991) reportan que linfocitos granulares circulantes deberían de ser considerados normales en animales domésticos, dado que se pueden presentar en pequeños números en todas las especies. Otra situación que se debe tomar en cuenta, es que los leucocitos son células con capacidad fagocítica, pudiendo ingerir gran variedad de microbios y otras estructuras que pueden causar confusión (Beaufils et al., 1995); de tal manera que la observación de puntos oscuros en el citoplasma celular no necesariamente se debe a una infección por *E. canis* sino a material nuclear fagocitado por monocitos, que puede observarse como inclusiones similares a *Ehrlichia* (Mylonakis et al., 2003). Finalmente, como el análisis de frotis sanguíneos se trata de una técnica subjetiva, depende



en gran manera de la experiencia del observador; sin embargo, se determinó una asociación positiva entre el hallazgo de inclusiones en frotis sanguíneo y resultados positivos a PCR, lo que está en concordancia con los resultados encontrados por Lakshman et al. (2007). Con respecto a las 44 muestras negativas en frotis sanguíneos pero positivas a PCR, estos resultados se deben a que el diagnóstico, mediante microscopía, es menos sensible que la técnica de PCR, ya que únicamente es posible detectar inclusiones compatibles con *E. canis* en un 4% de casos agudos de enfermedad (Waner & Harrus, 2000).

Los resultados obtenidos de muestras positivas en serología, pero negativas en la técnica de PCR, se deben a la persistencia de anticuerpos por períodos prolongados (Harrus et al., 1998a). Por el contrario, haber detectado 8 animales PCR positivos y serológicamente negativos, se puede deber a que los animales se encontraban en una fase temprana de la enfermedad, o que se trataran de animales inmunocomprometidos (Liddell et al., 2003). Otros estudios han reportado la detección de ADN sin la presencia de anticuerpos por serología (Murphy et al., 1998; Liddell et al., 2003; Ndip et al., 2005), así como el hallazgo de animales seropositivos pero PCR negativos (Dawson et al., 1996; Murphy et al., 1998). La alta sensibilidad analítica y diagnóstica de la técnica de PCR permite detectar, con certeza, un perro enfermo con *E. canis*; pero, también, animales infectados con *E. canis* en la fase subclínica; además, permiten monitorear la presencia o eliminación del agente durante la terapia con antibióticos. Finalmente, existen reportes de *E. canis* infectando a seres humanos en Venezuela, por lo que la detección certera de este agente en perros y garrapatas se hace más importante (Pérez et al., 1996; Pérez et al. 2006).

Aunque la observación de inclusiones por frotis sanguíneo mostró ser una técnica con baja sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infección de *E. canis*, ésta resulta ser barata y fácil de realizar; por ello, puede ser realizada prácticamente en cualquier lugar y momento; y es de gran utilidad cuando se acompaña de la historia clínica del animal y los resultados del hemograma. En contraste, la técnica de PCR necesita de personal calificado, equipo y material costoso; además, de requerir alrededor de 2 días para obtener un resultado; pero es una prueba diagnóstica útil y la herramienta del futuro para la detección de la bacteria.

Geográficamente, la mayoría de casos positivos de *E. canis* se registraron en la provincia de Alajuela; sin embargo, esto se debe, probablemente, a la mayor participación de veterinarios de esta provincia, quienes remitieron muestras sospechosas de ehrliquiosis a los laboratorios. En este estudio, no se encontró relación alguna entre sexo o edad y positividad a *E. canis*, lo cual ya había sido establecido en otros estudios (Sáinz et al., 1996; Waner & Harrus, 2000; Liddell et al., 2003). No se pudo establecer una correlación entre razas y positividad a *E. canis* dada la escasa cantidad de animales distribuidos en cada raza; sobre todo debido a que la mayoría de muestras de caninos participantes se reportaron como sin raza definida. Las alteraciones significativas en las variables hematológicas de hematocrito y hemoglobina en animales positivos a *E. canis*, concuerdan con reportes de otras investigaciones (Meneses, 1995; Castro et al., 2004). Por otra parte, Dagnone et al. (2003) reportaron la amplificación de ADN ehrliquial en 21,1% de perros anémicos, y

determinaron que este hallazgo es importante en perros positivos a *E. canis*. También, otro estudio, en Israel, demostró que, durante la primera semana de enfermedad, las alteraciones hematológicas fueron muy leves, observándose una ligera anemia, la cual se tornó más pronunciada después de 7 semanas (Keysary et al., 1996).

El hallazgo de valores bajos de hematocrito y hemoglobina, en combinación con otros signos en perros, y la detección de inclusiones en muestras sanguíneas representan un fuerte indicio de sospecha de ehrlichiosis; sin embargo, es necesaria la aplicación de una técnica molecular como método diagnóstico confirmativo. Se recomienda, por consiguiente, realizar el diagnóstico molecular como diagnóstico rutinario de *E. canis*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) y Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD). Al Dr. Labruna y Dr. Aguiar del Departamento de Medicina Veterinaria y Salud Animal, Universidad de Sao Paulo, Brasil, al Dr. Román Ganta, Kansas State University, EEUU. Nuestro especial agradecimiento a todos los veterinarios y estudiantes que participaron y ayudaron en la realización de este proyecto de investigación.

REFERENCIAS

- Aguirre, E., A. Sainz, S. Dunner, I. Amusatogui, L. López, F. Rodríguez-Franco, I. Luaces, O. Cortés, and M. A. Tesouro. 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet. Parasitol.* 125:365-372.
- Beaufils, J. P., J. Martin-Granel, and P. Jumelle. 1995. Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 30:189-195.
- Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, and S. I. Hancock. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2645-2651.
- Castro, M. B., R. Z. Machado, L. P. T. Aquino, A. C. Alessi, and M. T. Costa. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119:73-86.
- Dagnone, A. S., H. S. de Moraes, M. C. Vidotto, F. S. Jojima, and O. Vidotto. 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet. Parasitol.* 117:285-290.
- Dawson, J. E., B. E. Anderson, D. B. Fishbein, J. L. Sanchez, C. S. Goldsmith, K. H. Wilson, and W. Duntley. 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2741-2745.



- Dawson, J. E., K. L. Biggie, C. K. Warner, K. Cookson, S. Jenkins, J. F. Levine, and J. G. Olson. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am. J. Vet. Res.* 57:1175-1179.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families' *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
- Elias, E. 1991. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *J. Small. Anim. Pract.* 33:540-543.
- Felek, S., A. Unver, R. W. Stich, and Y. Rikihisa. 2001. Sensitive detection of *Ehrlichia chaffeensis* in cell culture, blood and tick specimens by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:460-463.
- Harrus, S., T. Waner, I. Aizenberg, J. E. Foley, A. M. Poland, and H. Bark. 1998a. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 36:73-76.
- Harrus, S., T. Waner, I. Aizenberg, and H. Bark. 1998b. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course. *J. Clin. Microbiol.* 36:2140-2142.
- Harrus, S., T. Waner, H. Bark, F. Jongejan, and A. W. C. A. Cornelissen. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37:2745-2749.
- Harrus, S., M. Kenny, L. Miara, I. Aizenberg, T. Waner, and S. Shaw. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 48:4488-4490.
- Hori-Oshima, S., G. L. Tinoco, S. A. Barreras, M. Moro, and J. Viñasco. 2006. Detección de *Ehrlichia canis* mediante ELISA y PCR en perros de Mexicali, Baja California. *En: VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria*. Set. 28 -30. Asociación Mexicana de Parasitólogos Veterinarios, A.C., México.
- Iqbal, Z., W. Chaichanasiriwithaya, and Y. Rikihisa. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32:1658-1662.
- Keysary, A., T. Waner, M. Rosner, C. K. Warner, J. E. Dawson, R. Zass, K. L. Biggie, and S. Harrus. 1996. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet. Parasitol.* 62:331-340.
- Kocan, A., G. Crowder Levesque, L. C. Whitworth, G. L. Murphy, S. A. Ewing, and R. W. Barker. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* 6:477-480.

- Lakshmanan, B., L. John, S. Gomathinayagam, and G. Dhinakarraj. 2007. Molecular detection of *Ehrlichia canis* from blood of naturally infected dogs in India. *Vet. Archiv.* 77:307-312.
- Liddell, A. M., S. L. Stockham, M. A. Scott, J. W. Sumner, C. D. Paddock, M. Gaudreault-Keener, M. Q. Arens, and G. A. Storch. 2003. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. *J. Clin. Microbiol.* 41:4617-4622.
- Lockhart, J. M., W. R. Davidson, D. E. Stallknecht, J. E. Dawson, and E. W. Howerth. 1997. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. *J. Clin. Microbiol.* 35:1681-1686.
- López, J., A. Castillo, M. Muñoz, and S. Hildebrandt. 1999. Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. *Arch. Med. Vet.* 31:211-214.
- Meneses, A. 1995. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *Vet. Rec.* 137:46-47.
- Murphy, G. L., S. A. Ewing, L. C. Whitworth, J. C. Fox, and A. A. Kocan. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79:325-339.
- Mylonakis, M. E., A. F. Koutinas, C. Billinis, L. S. Leontides, V. Kontos, O. Papadopoulos, T. Rallis, and A. Fytianou. 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet. Microbiol.* 91:197-204.
- Neer, T. M., E. B. Breitschwerdt, R. T. Greene, and M. R. Lappin. 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J. Vet. Intern. Med.* 16:309-315.
- Ndip, L.M., R. N. Ndip, S. N. Esemu, V. L. Dickmu, E. B. Fokam, D. H. Walker, and J. W. McBride. 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* 111:59-66.
- Pérez, M., Y. Rikihisa, and B. Wen. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34:2133-2139.
- Pérez, M., M. Bodor, C. Zhang, Q. Xiong, and Y. Rikihisa. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1078: 110-117.
- Rímolo, M. 2006. Prevalencia serológica y citológica de la ehrlichiosis canina en Costa Rica. Tesis de grado. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Rodríguez-Vivas, R. I., R. E. F. Albornoz, and G. M. E. Bolio. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.* 127:75-79.
- Romero, L. E., A. I. Meneses, L. Salazar, M. Jiménez, J. J. Romero, D. M. Aguiar, M. B. Labruna, and G. Dolz. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res. Vet. Sc.* 91:95-97.



- Sáinz, A., S. Delgado, I. Amusatogui, M. A. Tesouro, and P. Cármenes. 1996. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain). *Prev. Vet. Med.* 29:1-7.
- Standaert, S.M., T. Yu, M. A. Scott, J. E. Childs, C. D. Paddock, W. L. Nicholson, J. Singleton Jr, and M. J. Blaser. 2000. Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J. Infect. Dis.* 181:1082-1088.
- Waner, T. and S. Harrus. 2000. Canine monocytic ehrlichiosis. [en línea]. Consultado 16 Octubre del 2007. <http://www.ivis.org>.
- Waner, T., S. Harrus, F. Jongejan, H. Bark, A. Keysary, and A. W. Cornelissen. 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 95:1-15.
- Wen, B., Y. Rikihisa, J. M. Mott, R. Greene, H. Y. Kim, N. Zhi, G. C. Couto, A. Unver, and R. Bartsch. 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* 35:1852-1855.
- Weiser, G.M., M. A. Thrall, R. Fulton, E. R. Beck, L. A. Wise, and J. L. Steenhouse. 1991. Granular Lymphocytosis and Hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 27:84-88.