

## NOTAS TÉCNICAS

### Infección por *Ehrlichia canis*: patogenia, diagnóstico y recomendaciones terapéuticas

Hermógenes Salazar Zúñiga, Est.<sup>1</sup>; Edwin F Buritica Gaviria, MVZ, Esp., MSc.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima; <sup>2</sup>Grupo de investigación en medicina y cirugía en pequeños animales, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad del Tolima.

hermogenes45@hotmail.com

#### Introducción

*La ehrlichiosis canina o pancitopenia tropical canina en una enfermedad ocasionada por la rickettsia Ehrlichia canis (EC) cuyas células hospedadoras son los monocitos y produce un cuadro patológico caracterizado por presentar síndromes febriles, trombocitopenia, organomegalia, uveítis anterior, artritis, meningitis, falla renal y si no es tratada a tiempo la muerte del paciente (Wagner et al., 2004; Manna et al., 2004; Yuet et al., 2007). Su agente etiológico Ehrlichia canis es transmitido por medio de la picadura de la garrapata Rhipicephalus sanguineus cuando ésta ha sido expuesta a un portador de la enfermedad (Torres y De la Fuente, 2006). Esta infección ha sido reportada como zoonosis desde 1986 (Center for Food Security & Public Health, 2002) lo que resalta su importancia en la salud pública.*

#### Patogenia de la Ehrlichiosis canina

Después de la infección y tras un período de incubación de 8 a 20 días (Baneth, 2006) la enfermedad se manifiesta en tres formas: aguda, subaguda y crónica (Wenet et al., 1997); la fase aguda tiene una duración variable de 1 a 4 semanas, las demás fases pueden durar de meses hasta años. Los signos más frecuentes considerados en la Ehrlichiosis según la New York Academy of Sciences, son: fiebre marcada, anorexia, emaciación, hepatomegalia, esplenomegalia, disturbios cardiacos o respiratorios, alteraciones nerviosas y oculopatías (Unveret et al., 2006). Entre los problemas oculares: la uveítis anterior, la queratoconjuntivitis, el hifema, la coriorretinitis son las afecciones más comúnmente presentadas en los pacientes con la enfermedad, la cual puede también manifestar en los pacientes poliartritis y polimiositis (Baneth, 2006).

Las afecciones nerviosas son debidas principalmente a la vasculitis, meningoencefalitis o hemorragias sobre el sistema nervioso central o periférico; la patología renal asociada a *E. canis* se demuestra como una glomerulonefritis por inmunocomplejos dando como hallazgo al laboratorio una proteinuria marcada. La trombocitopenia, leucopenia, anemia normocítica normocrómica, son los hallazgos más significantes en el cuadro hemático (Botros et al., 1995; Gaunt et al., 1996; Unver, 2006).

El momento de infección puede ser difícil de determinar ya que ésta puede llegar sin la presencia de los síntomas de la enfermedad, pero se ha determinado que el pico de evolución de la infección se da aproximadamente en la tercera o cuarta semana pos-infección los síntomas presentados en esta fase dependen en duración y presentación de la respuesta única del organismo infectado, además algunos de los valores hemáticos y bioquímicos pueden mostrarse alterados como respuesta sistémica (Hasegawa, 2005).

Grandes infiltrados mononucleares en vísceras, ojos y médula ósea evidencian la presencia de células infectadas en esas locaciones las cuales generan un proceso inflamatorio inmunomediado siendo inicialmente la respuesta humoral expresada en una hipergammaglobulinemia (después necesariamente la respuesta celular en la cual la primera línea de ataque son los linfocitos T citotóxicos (Gaunt, 1996). Según Tizar, en respuesta a la síntesis de integrinas y selectinas de epitelio vascular cerca al sitio de daño histiocitos los cuales seguidos por el ataque de macrófagos liberan TNF- $\alpha$  resultando en hepatotoxicidad lo que explica una elevación de las enzimas citosomales hepáticas (ALT y AST) en sangre como también una aparente supresión de la actividad eritropoyética medular (Tizard, 1998).

El pronóstico de la enfermedad depende de la capacidad del huésped de responder ante la infección de manera

equilibrada, una producción excesiva de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos y poca producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos resulta en el desenvolvimiento de choque séptico en infecciones por *E. canis* (Hasegawa, 2005). La hipoalbuminemia puede observarse en el transcurrir de la inflamación aguda en respuesta a estímulos de TNF- $\alpha$ , IL1 e IL6 ya que esta es una proteína de fase aguda negativa la cual descende sus concentraciones junto a la de prealbúmina y transferrina (Tizar, 1998).

La fase crónica de la enfermedad se caracteriza por el deterioro de la producción medular de los elementos sanguíneos generando pancitopenia (Torres y De la Fuente, 2006), la insuficiencia renal es una de las consecuencias del proceso crónico, puesto que la acumulación de inmunocomplejos en su parénquima, lo hacen susceptibles a un ataque por los leucocitos (McBride et al., 2001; McBride et al., 2003).

## Identificación del agente

Por ser una enfermedad de distribución mundial ha sido estudiada por medio de diferentes técnicas de las cuales las mayormente reportadas son: citología, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), western blot (Harruset al., 2002; Watanabe et al., 2004; O'Connoret al., 2006).

Existen diferentes métodos y estrategias para el diagnóstico de *E. canis*, estas difieren en especificidad, tiempo, sensibilidad, complejidad y en los costos. El aislamiento de *E. canis*, permite la aplicación de diferentes técnicas para la serotipificación, y secuenciación de ADN (Harruset al., 2002), siendo necesarias instalaciones y personal especializado para la consecución de estas. Es posible la identificación de *E. canis* de forma indirecta, por la identificación de anticuerpos contra *E. canis* en especial inmunoglobulina G, puede ser realizada por pruebas como inmunofluorescencia indirecta, ELISA, Western immunoblotting y Snap test, las tres primeras realizadas dentro del laboratorio clínico y las últimas disponibles para ser efectuadas como pruebas rápidas en el consultorio.

La identificación de *E. canis* en citologías es más eficiente realizándola de nódulos linfáticos, el frotis de sangre periférica o de la capa flogística obtenida por centrifugación es un hallazgo diagnóstico, más debe ser muy bien evaluado para no ser confundido con plaquetas, gránulos azurófilos linfocitarios, cuerpos linfoglándulares y materiales nucleares fagocitados (Mylonakis et al., 2003) los falsos positivos dados por una mala lectura de placa y los falsos negativos al no encontrarse mórulas fuera de la fase aguda hacen de esta una prueba ineficiente para medir seroprevalencia.

En un estudio en el que se comparó PCR, cultivo del parásito, IFA y Western immunoblotting para la detección temprana del parásito se encontró que el cultivo celular (en células DH28) y el re-aislamiento es el método más sensible y definitivo para el diagnóstico temprano de la ehrlichiosis. No obstante, se necesitan entre 14 a 34 días para obtener resultados positivos, por lo que no es un método conveniente en la práctica clínica (Waneret al., 2001).

Se ha reportado que la prueba más aceptada para la detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* es inmunofluorescencia indirecta (IFA) aunque se han reportado reacciones cruzadas con *Ehrlichia* spp, y por lo general la presencia de títulos serológicos contra *Ehrlichia* spp son menores a los presentados contra *E. canis* (Waneret al., 1998).

La PCR es usada como herramienta diagnóstica ya que identifica directamente el ADN de *E. canis*. La prueba de PCR anidada presenta mayor especificidad y sensibilidad cuando los pacientes están siendo tratados con doxiciclina, ya que IFA puede dar valores positivos correspondientes a valores residuales de la infección o por la exposición en zonas endémicas aún sin infección aparente. Más si es posible, se deberían utilizar en conjunto las dos pruebas (Wenet al., 1997).

El uso de rMAP2 ELISA, Snap3Dx, Dip-S-Ticks y Snap Canine Combo, tienen una concordancia del 97,0, 89,8, 85,1 y 82,9 respectivamente comparadas con IFA (Bélanger et al., 2002) y se encuentran disponibles en Colombia.

Para seleccionar el mejor método diagnóstico de *E. canis* se debe encontrar el equilibrio entre sensibilidad, especificidad, tiempo y costo. Para el caso de los laboratorios clínicos se debe establecer el cultivo de *E. canis*, para la identificación del hemoparásito y con este material poder realizar pruebas para su tipificación molecular, pero en los estudios de seroprevalencia la prueba más aceptada es IFA (Pusterla et al., 1998; Waneret al, 2001; Ndipet al., 2005).

## Recomendaciones terapéuticas

Los organismos pertenecientes al género *Ehrlichia* son susceptibles a las tetraciclinas. La doxiciclina es el derivado semisintético del grupo de las tetraciclinas más comúnmente empleado y de elección para el tratamiento de infecciones agudas asociadas al hemoparásito usado a una posología de 10 mg/kg; resultados de recuperación clínica se han reportado dentro de las primeras 48 a 72 horas después de la instauración de terapias que incluyen este medicamento, aun así es recomendado mantener el tratamiento durante 3 semanas hasta 28 días; algunos perros pueden ser portadores después del tratamiento (McClure et al., 2010).

La aplicación de dipropionato de imidocarba mostrado ser un efectivo tratamiento frente a las infecciones hemoparasitarias asociadas a la ehrlichiosis canina (como babesiosis) al ser suministrado en dos dosis separadas de 5-7 mg/kg, vía intramuscular o subcutánea, cada 15 días (Matthewman et al., 1994; Sainz et al., 2000; Vincent, 2004). Este fármaco es clínicamente tan eficaz como la doxiciclina, respondiendo favorablemente los perros al tratamiento en 24-72 horas, en el caso de formas agudas o crónicas leves. No obstante, se ha observado una normalización más lenta, tanto del recuento plaquetario como del proteinograma, en aquellos casos tratados con dipropionato de imidocarb (Sainz et al., 2000). Con relativa frecuencia se presentan, tras la administración de dipropionato de imidocarb, efectos secundarios como disnea, sialorrea, diarrea, exudado nasal, taquicardia y temblores, que parecen ser debidos a un efecto anticolinesterasa provocado por el fármaco (Ogunkoya et al., 1981; Woody y Hoskins, 1991). Estos signos remiten tras la administración de sulfato de atropina a dosis de 0,05mg/kg (Ogunkoya et al., 1981). Este, más sin embargo debe ser utilizado en combinación con doxiciclina cuando hay una sospecha de coinfección con *Babesia canis* o *Hepatozoon canis*.

Es recomendado el control de las garrapatas y su ambiente para prevenir el contagio de esta enfermedad como se ha mencionado anteriormente. Entre los fármacos más comúnmente empleados para este fin se encuentran: Fipronil o Selamectina caracterizados por su efecto residual. Los signos clínicos expresados por los animales afectados tales como: picos febriles, anorexia y decaimiento al igual que las anomalías sistémicas como: anemia, trombocitopenia, insuficiencia renal o hepática deberían ser tratados de manera paliativa hasta controlar al infector.

## Referencias

Baneth, G., 2006. Canine ehrlichiosis – a silent killer. Memorias del congreso mundial WSAVA. [www.ivia.org/proceedings/wsava/2006/lecture16/baneth1.pdf](http://www.ivia.org/proceedings/wsava/2006/lecture16/baneth1.pdf) Consulta el 6 de Junio de 2011

Bélangier, M., Sorenson, HL., France, MK., Bowie, MV., Barbet, AF., Breitschwerdt, EB., Alleman, R., 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of Ehrlichia canis infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 40(9):3506–3508

Botros, BA., Elmolla, MS., Salib, AW., Calamaio, CA., Dasch, GA., Arthur, RR., 1995. Canine ehrlichiosis in egypt: sero-epidemiological survey. *Onderstepoort J Vet Res.* 62(1):41–43.

Center for food security and public health, College of veterinary medicine Iowa State University. *Rhipicephalus appendiculatus* - Brown Ear Tick. Disponible en: [http://www.ivia.org/advances/disease\\_factsheets/rhipicephalus\\_appendiculatus.pdf](http://www.ivia.org/advances/disease_factsheets/rhipicephalus_appendiculatus.pdf) Consulta el 21 de Abril de 2011

Gaunt, SD., Corstvet, RE., Berry, CM., Brennan, B., 1996. Isolation of Ehrlichia canis from dogs following. Subcutaneous inoculation. *J Clin Microbiol.* 34(6):1429–1432

El uso de terapias corticoides a dosis inmunosupresoras está indicado en las infecciones por *E. canis* con el fin de evitar la presentación de la coagulación intravascular diseminada (CID); entre los fármacos empleados para este fin se encuentra como primera opción la prednisolona, usada a posologías de 2 mg/kg (Vincent, 2004).

Las transfusiones de sangre entera son necesarias cuando las pérdidas sanguíneas por hemólisis intravascular o pérdidas por sangrado están presentes (Woody y Hoskins, 1991). La alimentación por sonda nasoesofágica, tubo esofágico o gástrico es necesaria en los pacientes con anorexia prolongada y decaimiento; en pacientes con esplenomegalia que no reportan evolución satisfactoria con el tratamiento y presentan dolor abdominal y pérdidas rápidas en el hematocrito, deben ser realizadas imágenes por medio de ecografía, puesto que es posible la presentación de torsión esplénica aguda.

## Conclusión

La ehrlichiosis canina es una enfermedad de amplia distribución en nuestro país, que debe ser atendida a la mayor brevedad posible y sobre la cual pesan planes preventivos de fácil alcance para el común de propietarios de caninos. Hoy en día, el uso de diversas herramientas diagnósticas como: IFA, ELISA, PCR y Cultivo celular se encuentran en su orden al alcance de los profesionales Colombianos para el diagnóstico rápido de su agente causal. Los planes terapéuticos estarán enfocados a eliminar al agente infeccioso así como también a restablecer las funciones del organismo que han sido alteradas.

Hasegawa, MY., 2005. Dinámica de infección experimental de canes por: Ehrlichia canis, aspectos clínicos, de laboratorio y respuesta inmune humoral y celular. Tesis (Doctorado) Universidad de Sao Paulo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Clínica médica. 134p

Harrus, S., Alleman, AR., Bark, H., Mahan, SM., Waner, T., 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis. *Vet Microbiol.* 86(4):361-368

Manna, L., Alberti, A., Pavone, LM., Scibelli, A., Staiano, N., Gravino, AE., 2004. First molecular characterization of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a dog in South Italy. *Vet J.* 167(3):224–227.

Matthewman, LA., Kelly, PJ., Brouqui, P., Raoult, D., 1994. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of Ehrlichia canis infection. *J S Afr Vet Assoc.* 65(3):104-107.

Mylonakis, ME., Koutinas, AF., Billinis, C., Leontides, LS., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a comparison between five methods. *Vet Microbiol.* 91(2-3):197-204

- McBride, JW., Corstvet, RE., Breitschwerdt, EB., Walker, DH., 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *J Clin Microbiol.* 39(1):315-322.
- McBride, JW., Corstvet, RE., Gaunt, SD., Boudreaux, C., Guedry, T., Walker, DH., 2003. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect Immunol J.* 71(5):2516-2524
- McClure, JC., Crothers, ML., Schaefer, JJ., Stanley, PD., Needham, GR., Ewing, SA., Stich, RW., 2010. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 54(12):5012-5020
- Ndip, LM., Ndip, RN., Esemu, SN., Dickmu, VL., Fokam, EB., Walker, DH., McBride, JW., 2005. Ehrlichial infection in cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet Microbiol.* 111 (1-2):59-66
- O'Connor, TP., Hanscom, JL., Hegarty, BC., Groat, RG., Breitschwerdt, EB., 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *Amer J Vet Res.* 67(2):206-210
- Ogunkoya, AB., Adeyanju, JB., Aliu, YO., 1981. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *J Small Anim Pract.* 22(12):775-777
- Pusterla, N., Pusterla, JB., Deplazes, P., Wolfensberger, C., Müller, W., Hörauf, A., Reusch, C., Lutz, H., 1998. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and granulocytic ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 36(12):3460-3462.
- Sainz, A., Tesouro, MA., Amusatogui, I., Rodriguez, F., Mazzucchelli, F., Rodriguez, M., 2000. Prospective comparative study of three treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. *J Vet Intern Med.* 14(2):134-139
- Tizard, IR., 1998. *Inmunología veterinaria*. 5ta edición. Editorial McGraw - Hill Interamericana. México. 567p
- Torres-Mejía, AM., De la Fuente, J., 2006. Risks associated with ectoparasites of wild mammals in the department of Quindío, Colombia. *Int J Appl Res Vet Med.* 4(3):187-190
- Unver, A., Huang, H., Rikihisa, Y., 2006. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. *Annals of the New York academy of Sciences*, 1078(1):482-486.
- Vincent, NA., 2004. Canine and feline ehrlichiosis. *Compendium.* 6(3):7-12
- Wagner, ER., Bremer, WG., Rikihisa, Y., Ewing, SA., Needham, GR., Unver, A., Wang, X., Stich, RW., 2004. Development of a p28-based PCR assay for *Ehrlichia chaffeensis*. *Molecular and Cellular Probes.* 18(2):111-6.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, AW., 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):1-15.
- Waner, T., Strenger, C., Keysary, A., Harrus, S., 1998. Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the Ehrlichia phagocytophilagenogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 66(3-4):237-243.
- Watanabe, M., Okuda, M., Tsuji, M., Inokuma, H., 2004. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. *Vet Parasitol.* 124(1-2):101-107.
- Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, JM., Greene, R., Kim, HY., Zhi, N., Couto, GC., Unver, A., Bartsch, R., 1997. Comparison of nested pcr with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol.* 35(7) 1852-1855.
- Woody, BJ., Hoskins, JD., 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract.* 21(1):75-98.
- Yu, X., McBride, JW., Walker, DH., 2007. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Vet Parasitol.* 143(3-4):337-346