

COMUNICACIÓN

Presencia de *Ehrlichia* sp y *Hepatozoon* sp en canes infestados con garrapatas o con exposición previa atendidos en un centro veterinario en Trujillo, Perú

Presence of *Ehrlichia* sp and *Hepatozoon* sp in dogs infested with ticks or with previous exposure attended at a veterinary centre in Trujillo, Peru

Katherine Alva Díaz¹, Juan Rojas-Moncada¹, Luis Vargas Rocha^{1,2}, Severino Torrel Pajares^{1*}

RESUMEN

El presente estudio determinó la prevalencia de mórulas de *Ehrlichia* sp y gamontes de *Hepatozoon* sp en perros atendidos en un centro médico veterinario de la ciudad de Trujillo. Se tomaron muestras sanguíneas de perros infestados con garrapatas o con exposición en los tres meses previos al estudio. Se colectó 3 mL de sangre de la vena cefálica de 95 perros en tubos EDTA. Las muestras fueron centrifugadas. Se colocó una gota de la capa flogística de cada muestra sobre una lámina portaobjetos la que se extendió con una laminilla cubreobjetos y fue sometida a la tinción Wright. Los frotis se observaron en microscopio óptico a 40X y 100X. Se halló una prevalencia a *Ehrlichia* sp de $31.6 \pm 9.4\%$. No se observó presencia de gamontes de *Hepatozoon* sp.

Palabras clave: diagnóstico, leucocitos, microscopía, sangre, capa flogística, parásito, enfermedad

¹ Laboratorio de Parasitología Veterinaria y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú

² Círculo de Estudios e Investigación en Ciencias Veterinarias - CEICIVET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú

* E-mail: storrel@unc.edu.pe

Recibido: 22 de mayo de 2023

Aceptado para publicación: 3 de enero de 2024

Publicado: 29 de febrero de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The present study determined the prevalence of *Ehrlichia* sp morulae and *Hepatozoon* sp gamonts in dogs treated at a veterinary medical centre in the city of Trujillo. Blood samples were taken from dogs infested with ticks or exposed in the three months prior to the study. Blood samples (3 mL) were collected from the cephalic vein of 95 dogs in EDTA tubes. The samples were centrifuged. A drop of the phlogistic layer of each sample was placed on a slide, which was extended with a coverslip and subjected to Wright staining. The smears were observed under an optical microscope at 40X and 100X. A prevalence of *Ehrlichia* sp of $31.6 \pm 9.4\%$ was found. No presence of *Hepatozoon* sp gamonts was observed.

Key words: diagnosis, leukocytes, microscopy, blood, phlogistic layer, parasite, disease

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia es una bacteria gramnegativa intracelular de la familia Anaplasmataceae, parásito obligado con tropismo por las células hematopoyéticas (Dumler *et al.*, 2001). Tiene distribución mundial y muy frecuente en perros, aunque es de mayor preocupación en climas tropicales y templados (Gonzaga *et al.*, 2018). También se ha informado en otras especies de mamíferos y presenta un riesgo zoonótico mínimo (Little, 2010). La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* es el vector biológico de este patógeno (Dantas-Torres, 2010).

El protozoario *Hepatozoon* produce la hepatozoonosis, enfermedad distribuida a nivel mundial que afecta diversas especies de animales (Maia *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2014; Meneses *et al.*, 2016). En caninos, *Hepatozoon canis* se transmite con la ingestión de garrapatas *R. sanguineus* infectadas con oocistos maduros o esporulados (Baneth *et al.*, 2007; Pasa *et al.*, 2008). Además de las garrapatas, *Hepatozoon* también se ha encontrado en ácaros, mosquitos, pulgas, piojos y moscas (Smith, 1996; Baneth *et al.*, 2001; Van *et al.*, 2015).

Es común encontrar coinfección entre *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*, así como con otros hemoparásitos, por lo que el diagnóstico rutinario de ambos parásitos se basa en la microscopía y las características morfológicas observadas en sangre periférica posterior a coloraciones tipo Romanowsky (Baneth *et al.*, 2007; Rey-Valerion *et al.*, 2012). Sin embargo, en el caso del *Hepatozoon*, el extendido de la capa flogística (concentración leucocitaria) aumenta las probabilidades de observación positiva de gamontes (Martin *et al.*, 2022).

Para el diagnóstico de ehrlichiosis como de hepatozoonosis se han desarrollado pruebas serológicas y moleculares, siendo estas últimas las mejores, con sensibilidad mayor al 85% (Mylonakis *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2009). Sin embargo, las pruebas moleculares no siempre se encuentran disponibles para pruebas inmediatas por el alto costo de los kits, necesidad de equipos sofisticados, conocimiento teórico práctico y otras limitaciones. Por otro lado, a pesar de que en la actualidad existen pruebas diagnósticas serológicas comerciales, los costos pueden no estar al alcance de los propietarios de canes, por lo que se opta por métodos más prácticos y menos costosos. Tradicionalmente

los hemoparásitos se diagnostican mediante signos clínicos, ayudados de la epidemiología de las enfermedades y hallazgos hematológicos en laboratorio. No obstante, existe una gran variabilidad en la aplicación de técnicas en laboratorio o clínica veterinaria, por lo que el presente estudio evalúa la prevalencia de *Ehrlichia* sp y *Hepatozoon* sp en perros atendidos en un centro médico veterinario de la ciudad de Trujillo, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

La anamnesis de los sujetos, recolección y coloración de las muestras sanguíneas se realizó en el Centro Médico Veterinario San Martín de la ciudad de Trujillo, Perú.

El tamaño de la muestra se determinó con una proporción esperada de 45% (Rabanal, 2014), nivel de confianza de 90% y precisión del 5%, resultando en 95 muestras sanguíneas. Únicamente se consideraron canes infestados con garrapatas o con exposición anterior en los tres meses previos, independientemente de la edad, raza y sexo.

Los pacientes caninos provenían de la misma ciudad (ubicada a una altitud de 30 m y temperatura promedio anual de 19.5 °C). Las muestras de sangre (3 mL) fueron colectadas de la vena cefálica con aguja 21G x 1½» en tubos al vacío (Vacutainer®) conteniendo EDTA. La lectura de los frotis se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.

La sangre se centrifugó a 157 g durante 15 min. Con una micropipeta se retiró el plasma y se extrajo una parte de la capa flogística (0.05 mL) que fue extendida en una lámina portaobjetos para su coloración mediante la tinción Wright. Los frotis se observaron en microscopio óptico a 40X y 100X.

Los resultados se sometieron a una estadística básica de prevalencia e intervalo de confianza al 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron mórulas de *Ehrlichia* sp en 30 muestras, correspondiente a 31.6 ± 9.4%, valor inferior a un estudio realizado en esta ciudad donde se halló una prevalencia de 45% en 100 perros, usando la técnica de frotis sanguíneo (Rabanal, 2014). Estas diferencias podrían atribuirse a que en dicha investigación se consideró el hallazgo de *Ehrlichia* sp en plaquetas, lo cual se tiene que reconsiderar ya que en estas estructuras se ubica la bacteria *Anaplasma platys* (Valenciano *et al.*, 2014; Franco-Zetina *et al.*, 2019). Por otro lado, debido a una mayor presencia de polimorfonucleares y con ella *Ehrlichia canis* en sangre periférica, generalmente la toma de sangre se realiza de la región auricular (Franco-Zetina *et al.*, 2019), tal como se realizó en dicho estudio, en contraste al presente estudio que se extrajo sangre de la vena cefálica.

En una región limítrofe con similares condiciones ambientales (Huánuco) al del presente estudio, se halló una prevalencia de 42.7% a *E. canis* en perros de casa y 63.9% en perros callejeros, donde se reportó la condición de calle como un factor de riesgo de infestación por garrapatas y de padecer *E. canis* (Huerto-Medina *et al.*, 2015).

Las mórulas de *Ehrlichia* sp se identificaron en células polimorfonucleares y mononucleares de la línea blanca (Figura 1). *Ehrlichia canis* tiene afinidad por los leucocitos mononucleares (Mylonakis *et al.*, 2003; Lukács *et al.*, 2020), mientras que la observación de mórulas en neutrófilos comúnmente está asociados a perros infectados por *Ehrlichia ewingii* o *Anaplasma phagocytophilum* (Aguiar *et al.*, 2019; Lukács *et al.*, 2020).

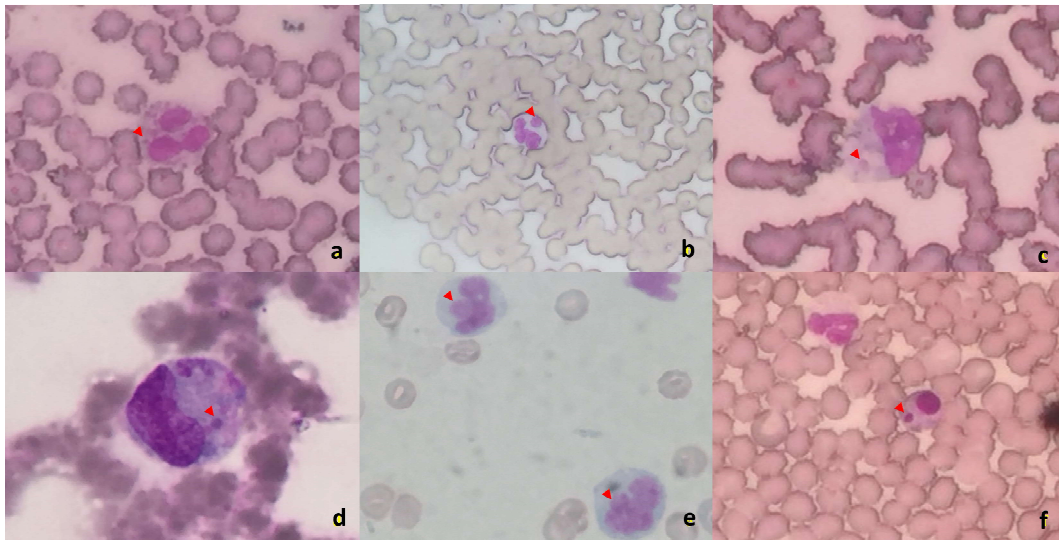


Figura 1. Presencia intracitoplasmática de múltiples mórulas de *Ehrlichia* sp en neutrófilo segmentado (a, b; 40X), monocito reactivo (c, 100X), en monocito (d, e; 40X) y en linfocito (f; 40X). Tinción Wright

Otros reportes en el país de *Ehrlichia canis* en perros presentaron prevalencias mayores a las del presente estudio. Así, Huerto-Medina *et al.* (2015) en Huánuco halló $51.3 \pm 8.3\%$ (77/150), mientras que Cusicanqui y Zúñiga (2020) reportaron una prevalencia de 59.4% (723/1716) en los distritos de Lima Metropolitana. Sin embargo, en estas investigaciones se usó un inmunoensayo cromatográfico como método diagnóstico, el cual detectó anticuerpos contra *E. canis* y no el parásito como tal, por lo que sus resultados pudieron estar sesgados, ya que es probable que los perros hayan sido pacientes recuperados a una infección previa, los anticuerpos podrán ser detectados por largo tiempo (Harrus *et al.*, 1998; Schaefer *et al.*, 2007; McClure *et al.*, 2010).

Se justifica el uso de la capa flogística en el diagnóstico de *Ehrlichia* sp y *Hepatozoon* sp porque es una técnica que ha demostrado óptimos resultados. Además, es una técnica económica y fácil de realizar, tiene mayor sensibilidad que el frotis sanguí-

neo, e incluso ha logrado mejores resultados que la sangre periférica, ganglio linfático, médula ósea y cultivo a corto plazo basado en la detección de mórulas de *Ehrlichia canis* (Mylonakis *et al.*, 2013).

A pesar del uso de la capa leucocitaria y que el procesado de las muestras se realizó de forma inmediata, no se observó la presencia de gamontes de *Hepatozoon* sp, congruente con otros estudios donde no se han reportado la presencia de *Hepatozoon* sp en perros en Perú.

LITERATURA CITADA

1. Aguiar DM, Rodrigues FP, Ribeiro MG, Santos B, Muraro LS, Taques IIG, Campos ANS, *et al.* 2019. Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. *Transbound Emerg Dis* E67: 135-141. doi: 10.1111/tbed.13390

2. **Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. 2001.** Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Parasitol* 87: 606-611. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0606:TOHCTD]2.0.CO;2
3. **Baneth G, Samish M, Shkap V. 2007.** Life cycle of *hepatozoon canis* (apicomplexa: adeleorina: hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol* 93: 283-299. doi: 10.1645/GE-494R.1
4. **Cusicanqui J, Zúñiga R. 2020.** Frecuencia serológica de *Ehrlichia canis* en caninos sospechosos de ehrlichiosis en los distritos de Lima Norte, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 31: e18164. doi: 10.15381/rievp.v31i3.18164
5. **Dantas-Torres F. 2010.** Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasite Vector* 3: 26. doi: 10.1186/1756-3305-3-26
6. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, et al. 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 ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Micr* 51: 2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145
7. **Franco-Zetina M, Adame-Gallegos J, Dzúl-Rosado K. 2019.** Effectivity of diagnostic methods for the detection of human and canine monocytic ehrlichiosis. *Rev Chil Infectol* 36: 650-655. doi: 10.4067/S0716-10182019000500650
8. **Gonzaga P, Sandes M, Bezerra C, Peckle M, Lins R, Vivas G, Rezende JA, et al. 2018.** Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Prev Vet Med* 159: 135-142. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.09.012
9. **Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Bark H. 1998.** Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol* 36: 2140-2142. doi: 10.1128/jcm.36.7.2140-2142.1998
10. **Huerto-Medina E, Dámaso-Mata B. 2015.** Factores asociados a la infección por *Ehrlichia canis* en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 32: 756-760. doi: 10.17843/rpmesp.2015.324.1769
11. **Little SE. 2010.** Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin N-Am Small* 40: 1121-1140. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.004
12. **Lukács RM, Peters IR, Eminaga S, Buckeridge DM. 2020.** *Ehrlichia canis* infection in the cerebrospinal fluid of a dog characterized by morulae within monocytes and neutrophils. *Vet Clin Path* 49: 470-475. doi: 10.1111/vcp.12882
13. **Maia JP, Crottini A, Harris DJ. 2014.** Microscopic and molecular characterization of *Hepatozoon domerguei* (Apicomplexa) and *Foleyella furcata* (Nematoda) in wild endemic reptiles from Madagascar. *Parasite* 21: 47. doi: 10.1051/parasite/2014046
14. **Martin PL, Pintos ME, Aquino S, Vidal DA, Arauz MS. 2022.** Hepatozoonosis en caninos domésticos del Gran Buenos Aires. *Rev Vet* 33: 246-252. doi: 10.30972/vet.3326191
15. **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. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 5012-5020. doi: 10.1128/AAC.01622-09

16. **Meneses A, Alvarado G, Runnebaum M, Herrera M, Gutiérrez-Espeleta G, Chaves A. 2016.** Primer reporte de *Hepatozoon procyonis* en Mapaches de Costa Rica. *Cienc Vet* 34: 51-54. doi: 10.15359/rcv.34-1.4
17. **Merino S, Martínez J, Masello JF, Bedolla Y, Quillfeldt P. 2014.** First molecular characterization of a *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting birds and description of a new species infecting storm petrels (Aves: Hydrobatidae). *J Parasitol* 100: 338-343. doi: 10.1645/13-325.1
18. **Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, Rallis T, et al. 2003.** Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol* 91: 197-204. doi: 10.1016/S0378-1135(02)-00298-5
19. **Pasa S, Kiral F, Karagenç T, Atasoy A, Seyrek K. 2008.** Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 33: 289-295. doi: 10.3906/vet-0801-11
20. **Rabanal L. 2014.** Prevalencia de *Ehrlichia* sp en caninos infestados con garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*), mediante frotis sanguíneo en la provincia de Trujillo. Tesis de Médico Veterinario. Cajamarca: Univ. Nacional de Cajamarca. 53 p.
21. **Ramos CA, Ramos RAN, Araújo FR, Guedes Jr DS, Souza IIF, Ono TM, Vieira AS, Pimentel DS, Rosas EO, Faustino MAG, Alvez LC. 2009.** Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev Bras Parasitol* V 18: 58-62. doi: 10.4322/rbpv.018e1011
22. **Rey-Valeirón C, Trujillo-Silva L, Martínez A, Ortiz G, Sambrano G. 2012.** Determinación de *Hepatozoon canis* mediante PCR en caninos domésticos de la Vela de Coro, estado Falcón, Venezuela. *Rev Cient-Fac Cien V* 22: 524-529.
23. **Schaefer JJ, Needham GR, Bremer WG, Rikihisa Y, Ewing SA, Stich RW. 2007.** Tick acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3394-3396. doi: 10.1128/aac.00358-07
24. **Smith TG. 1996.** The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J Parasitol* 82: 565-585. doi: 10.2307/3283781
25. **Valenciano AC, Cowell RL, Rizzi TE, Tyler RD. 2014.** Platelets. In: Valenciano AC, Cowell RL, Rizzi TE, Tyler RD (eds). *Atlas of canine and feline peripheral blood smears*. Elsevier. p 215-233.
26. **Van J, Davies AJ, Smit NJ. 2015.** Life cycle of *Hepatozoon affluomaloti* sp. n. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in crag lizards (Sauria: Cordylidae) and in culicine mosquitoes from South Africa. *Folia Parasitol (Praha)*. 62: 008. doi: 10.14411/fp.2015.008