



UNIVERSIDAD JUAN AGUSTÍN MAZA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LINFOCITOS EN
PERROS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI- *EHRlichia*
SPP.”**

**“MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF LYMPHOCYTES IN
DOGS WITH SPECIFIC ANTIBODIES TO *EHRlichia* *SPP.*”**

Directora: Vet. Neira, Gisela

Alumna: Logarzo Lorena Alejandra

MENDOZA, 2023.

INDICE

DEDICATORIA	II
RESÚMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MICROBIOLOGÍA Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO EHRLICHIA	6
TRANSMISIÓN	7
VECTOR	8
FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN EN PERROS	10
CAMBIOS HEMATOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE LINFOCITARIA ASOCIADA	13
DIAGNÓSTICO	17
TRATAMIENTO	19
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN.....	27

DEDICATORIA

RESÚMEN

La ehrlichiosis es una enfermedad con importante impacto en la salud de carnívoros domésticos y silvestres, causada por bacterias del género *Ehrlichia* pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae*, transmitida por la picadura de garrapatas infectadas, que puede afectar a perros y humanos. Es una enfermedad multisistémica cuyo vector responsable es la garrapata marrón, *Rhipicephalus sanguineus*. La alteración hematológica más frecuente es la trombocitopenia, pudiéndose observar también anemia, dependiendo estos cambios de la fase de la enfermedad en que se encuentre el animal afectado. El diagnóstico de la misma puede resultar un desafío para el veterinario clínico, debido a las diferentes fases y manifestaciones clínicas, las cuales pueden solaparse con otras enfermedades, incluyendo otras infecciosas, autoinmunes e incluso otras transmitidas por garrapatas. Los métodos de diagnóstico disponibles para nuestra región son serológicos, mediante detección de anticuerpos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el seguimiento de la evolución clínica de esta patología en caninos, los métodos complementarios más útiles han demostrado ser los estudios de rutina como el hemograma, mediante el conteo del número de plaquetas. Sin embargo, la trombocitopenia es común a otras enfermedades transmitidas por garrapatas. La presencia de linfocitos atípicos ha sido descrita por algunos autores en ehrlichiosis canina. El objetivo del presente estudio fue la caracterización morfológica y morfométrica de linfocitos atípicos en caninos con anticuerpos anti-*Ehrlichia* spp. Se examinaron extendidos sanguíneos de caninos con anticuerpos anti-*Ehrlichia* spp. Se caracterizaron morfológica y morfométricamente los linfocitos atípicos presentes en estos pacientes con microscopio óptico y ocular micrométrico calibrado, además del análisis mediante un software de análisis de imágenes. Se midieron y observaron 96 linfocitos de 10 pacientes con presencia de anticuerpos anti-ehrlichia. Se pudo observar alteraciones morfológicas y variaciones morfométricas por sobre los valores de referencia para la especie en los pacientes estudiados. Estos resultados representan los primeros en reportar información exacta acerca de la

morfometría de linfocitos atípicos en la fase crónica de ehrlichiosis canina. Esta información es relevante para la evaluación de la patología en caninos. Es importante continuar profundizando en el estudio de estas células para confirmar su utilidad para la evaluación diagnóstica de esta enfermedad.

Palabras claves: *Ehrlichia spp.*; Linfocitos; Perros; Ehrlichiosis monocítica canina; Morfometría.

lorenalogarzo@hotmail.com

ABSTRACT

Ehrlichiosis is a disease with a significant impact on health of domestic and wild carnivores, caused by bacteria of the *Ehrlichia* genus belonging to the Anaplasmataceae family, transmitted by the bite of infected ticks, which can affect dogs and humans. *Rhipicephalus sanguineus* represents the main vector of this disease in dogs. *Ehrlichia* spp. can mimic signs of a broad range of pathologies including infectious diseases, immune mediated diseases and tick borne diseases. The most frequent hematological disorder is thrombocytopenia, followed by anemia depending on the phase of the disease. The diagnosis of it can be a challenge for the clinical veterinarian, due to the different phases and multiple clinical manifestations. In our region the diagnostic methods are serology and polymerase chain reaction (PCR). Hematological changes such as thrombocytopenia are of great importance for evaluation of disease evolution. The presence of atypical lymphocytes has been reported as a feature of chronic ehrlichiosis. The aim of this study was to characterize the morphometry and morphology of lymphocytes present on dogs with positive serology for *Ehrlichia* spp. antibodies. Blood smears of positive dogs were stained and observed under light microscope using a calibrated micrometer and image analysis software. This study found that values of cell size and nuclear/cytoplasm ratio were above reference values for dogs. Also we describe the alterations in cell morphology. To the best of our knowledge, this is the first report to describe and quantify the morphology of lymphocytes of dogs with *Ehrlichia* spp. antibodies. It is of utmost importance to pursue with the morphological characterization of lymphocytes of dogs with chronic ehrlichiosis to seek if they can be used as a diagnostic tool of the disease.

Keywords: *Ehrlichia* spp.; Lymphocytes; Dogs; Canine monocytic ehrlichiosis; Morphometry.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo constituye la última instancia del proceso educativo en la carrera de Veterinaria en la Universidad Juan Agustín Maza. El mismo aborda la caracterización de los linfocitos presentes en extendidos sanguíneos de perros con presencia de anticuerpos anti *Ehrlichia spp.*, también fueron medidos y se han descrito diferentes características de su núcleo y citoplasma.

En las últimas décadas, la importancia de las enfermedades transmitidas por vectores tanto en la medicina humana como en la veterinaria se ha extendido de forma exponencial. Las garrapatas son luego de los mosquitos, los vectores más competentes en la transmisión de virus, bacterias, protozoarios y helmintos. Actualmente, la frecuencia de algunas enfermedades vectoriales ha ido aumentando en parte debido a los cambios climáticos, especialmente al calentamiento global, que también puede afectar la concentración de artrópodos vectores e influye directamente en la distribución geográfica y capacidad vectorial de los artrópodos vectores (Beugnet & Marié, 2009). Además, otros factores se han relacionado con la epidemiología cambiante de estas enfermedades, como muchas formas de transporte que han aumentado considerablemente, como la producción animal y traslado de animales de deporte y de compañía. Estos movimientos proporcionan muy buenas condiciones para la circulación de patógenos. La creciente movilidad de las poblaciones humanas y sus animales de compañía debido al modelo de recreación de pasar tiempo y viajar a lugares distantes junto a sus mascotas, apoya el intercambio de patógenos y vectores (Otranto & Dantas-Torres, 2010)

Se ha identificado la presencia de *Ehrlichia canis* en diferentes áreas de América, Europa y Asia. Se halló *E. canis* y *Anaplasma platys*, asociados a *Babesia vogeli* y *Hepatozoon canis* en caninos de Argentina (André, 2018; Paddock & Childs, 2003)

Además, en nuestra provincia se ha documentado la presencia de *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma tigrinum* parasitando perros, las cuales actúan como vectores de diferentes patógenos, como *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* y por lo tanto el riesgo epidemiológico de la transmisión de estas

enfermedades. En Mendoza se reportó la presencia de *Rickettsia massiliae* infectando *R. sanguineus*. Además de no ser zoonótico ha emergido también *Hepatozoon canis*, importante patógeno en perros (Mera y Sierra et al., 2017) Nuestro grupo de investigación ha corroborado mediante estudios moleculares la presencia de *Ehrlichia canis*, causante de ehrlichiosis monocitotrópica canina (EMC), en caninos y en garrapatas de la especie *R. sanguineus* de linaje templado; hallazgo de gran relevancia para el conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad, debido a que se suponía que este linaje de garrapata no actuaba como vector competente de *E. canis* (Sebastian et al., 2021) Se analizó la estacionalidad de seropositividad a *Ehrlichia spp.* donde se observaron dos picos durante el año, uno menor en otoño y otro mayor en primavera. Diferentes cepas nuevas de *Ehrlichia spp.* han sido descriptos en los últimos años también en Argentina (Mera Y Sierra & Neira, 2014; Mera Y Sierra et al., 2017)

Dos cepas diferentes de *Ehrlichia sp.* asociadas a *Amblyomma tigrinum* están circulando en áreas periurbanas de Argentina. La cepa *Ehrlichia* detectada en garrapatas de la provincia de San Luis, denominada *Ehrlichia sp.* cepa San Luis, está estrechamente relacionada con *Ehrlichia chaffeensis*. La nueva cepa de *Ehrlichia* detectada en la provincia de Córdoba, denominada *Ehrlichia sp.* cepa Córdoba, está filogenéticamente relacionada con tres cepas de *Ehrlichia* de Brasil, dos de ellas aisladas de carnívoros silvestres y la tercera aislada de caballos. La asociación de estas dos nuevas cepas con *A. tigrinum* tiene relevancia epidemiológica porque las etapas adultas de esta especie de garrapata son parásitos comunes de los perros en áreas rurales y periurbanas y son antropofílicas. La presencia de estas dos nuevas cepas de *Ehrlichia* implica un riesgo epidemiológico potencial en Argentina porque se sabe que algunas especies del género *Ehrlichia* son patógenas tanto para los mamíferos domésticos como para los humanos (Villaescusa et al., 2012)

En el desarrollo del presente trabajo planteó como objetivo medir y caracterizar linfocitos de perros con presencia de anticuerpos anti *Ehrlichia spp.*

MARCO TEÓRICO

MICROBIOLOGÍA Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO EHRLICHIA

El agente etiológico de la ehrlichiosis es una bacteria intracelular obligada Gram-negativa cocoide, que requiere de un mamífero como reservorio y de un artrópodo como vector. Este microorganismo tiene tropismo por leucocitos y plaquetas de animales y humanos (Harrus & Waner, 2011), invade el citoplasma alojándose dentro de vacuolas donde se multiplica por fisión binaria, originando un agregado de la bacteria o microcolonia denominadas “móculas”. Las especies del género *Ehrlichia spp*, pertenecen al orden de las Rickettsiales.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ehrlichia canis*

Reino	Bacteria
Subreino	Negibacteria
Filum	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Género	Ehrlichia
Especie	<i>Ehrlichia canis</i>

Fuente: Modificado del Integrated Taxonomic Information System, 2018.

La pared celular de *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.* es similar a las bacterias gram negativas, carece de peptidoglicanos y lipopolisacáridos. Esta bacteria al igual que los demás miembros de la familia *Anaplasmataceae* presenta tres estadios diferentes: cuerpos elementales (unidad bacteriana), cuerpos iniciales y mórulas. Los cuerpos elementales o células de centro denso (CD) son las formas maduras infectantes extracelulares, las cuales miden de 0,4 a 0,6 μm de diámetro. Estos elementos se adhieren a la superficie de la célula diana e ingresan por endocitosis mediada por caveolas (balsas celulares lipídicas) (Rikihisa 2010). Dentro de la célula huésped, las bacterias se desarrollan dentro de la vacuola rodeada de membrana plasmática celular, donde crean un nicho para la supervivencia y la reproducción. Las formas CD se transforman en unas formas intermedia IM1 y subsecuentemente pasa al cuerpo reticular (0,4-0,6 μm de ancho por 0,7-1,9 μm de largo). El cuerpo reticular se multiplica por fisión binaria, incrementando en número y forman inclusiones citoplasmáticas inmaduras de 1,0 a 2,5 μm de diámetro, denominadas cuerpos iniciales. (*Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 2016)

Después se transforman en unas formas intermedias IM2 hasta formar las mórulas (vacuola con 20 a 40 cuerpos elementales), las cuales pueden observarse en el microscopio de luz óptico como inclusiones intracitoplasmáticas que se colorean de azul con las coloraciones tipo Romanowski (generalmente la coloración rápida de Diff-Quik). Las mórulas miden aproximadamente de 4 a 6 μm de diámetro y son las formas características utilizadas para el diagnóstico microscópico. Después de unos pocos días, los cuerpos elementales se liberan de la vacuola y quedan libres fuera de la célula para iniciar un nuevo ciclo infeccioso. (Rikihis 2006; Zhang et al. 2007; Straube 2010; Procajto et al. 2011; Moumène y Meyer 2015)

TRANSMISIÓN

La garrapata se convierte en un vector del patógeno, cuando se alimenta de la sangre de un animal infectado, al ingerir leucocitos con *Ehrlichia spp.* en su

citoplasma. Este hecho es más frecuente cuando el perro se encuentra en la fase aguda de la enfermedad, cuando hay bacteremia persistente, pues es en esta fase cuando se encuentra un mayor número de leucocitos infectados en el torrente sanguíneo. Las secreciones de las glándulas salivares de la garrapata constituyen una fuente de transmisión potencial para el perro, estas secreciones las cuales contienen una gran variedad de moléculas, entre ellas, anticoagulantes, e inmunomoduladoras facilitan la adquisición y transmisión de patógeno; la inflamación causada por la mordedura del artrópodo facilita y favorece la llegada inmediata de leucocitos al lugar donde se encuentra alimentándose este ectoparásito. (Cardozo, Santos, Fachin, França, & Marins, 2011)

La transmisión de *Ehrlichia spp.* en la garrapata es de tipo transestadial, pues la garrapata adquiere el microorganismo en forma de larva o ninfa, transmitiéndola como ninfa o adulto. Cuando una garrapata portadora entra en contacto con un nuevo animal hospedador le transmite la bacteria a través de la saliva, en el momento de alimentarse. También se produce la infección a través de transfusiones sanguíneas en las que el animal donador este infectado por el patógeno. Existe un estudio que indica que la transfusión con sangre de perros con infección crónica, que habían contraído la infección hace 5 años, provocó la enfermedad en los perros receptores (Hajdušek et al., 2013).

VECTOR

El artrópodo vector involucrado en la transmisión de la enfermedad es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. En el mundo existen más de 800 especies de garrapatas. Estos artrópodos están considerados entre los más importantes vectores de enfermedades infecciosas, ya que poseen la capacidad de transmitir microorganismos patógenos como virus, bacterias y protozoos; que pueden afectar gravemente al hospedador, e incluso ocasionar su muerte. (Parola et al., 2014). Las garrapatas duras son parásitos hematófagos que presentan gran variedad de hospedadores. *Rhipicephalus sanguineus* es una garrapata dura de

tres hospedadores, cosmopolita y se denomina cotidianamente como garrapata marrón común del perro.

El ciclo comienza cuando los huevos eclosionan y en un periodo de 6 días a varias semanas después se convierten en larvas, las cuales tienen tres pares de patas. A bordo de su hospedador estas larvas se alimentan de sangre durante 3 a 10 días y posteriormente caen al suelo donde experimentan la muda larval, este proceso tiene una duración de 5 a 15 días donde posteriormente pasan a su siguiente estadio móvil de ninfa. Las ninfas se arriman a su hospedador y se alimentan de 3 a 11 días, después de este periodo de tiempo dejan a su hospedador para poder mudar nuevamente. En condiciones favorables a los 63 días se convierten en machos y hembras adultas listas para parasitar a su tercer hospedador, donde se alimentan y reproducen. La hembra luego de estar abastecida con suficiente sangre y fecundada, se deja caer al suelo donde pone de 1.000 a 3.000 huevos en un periodo de tres meses, reiniciando el ciclo. (Sanchez et al., 2012)

El vector de *E. canis* a nivel mundial es la garrapata marrón común del perro *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Sebastian et al., 2020). En América, *R. sanguineus s. l.* está conformada por al menos dos linajes con distinta distribución biogeográfica y posiblemente distinta competencia vectorial (Cicuttin, De Salvo, & Gury Dohmen, 2016). El linaje tropical (LTr) se ubica en localidades tropicales y subtropicales, incluyendo el norte de Argentina, y se encuentra relacionado filogenéticamente con garrapatas del complejo *R. sanguineus* de África, mientras que el linaje templado (LTe) se distribuye en localidades templadas de Argentina, Chile y Uruguay, y se relaciona con garrapatas del complejo *R. sanguineus* del oeste de Europa (Chitimia-Dobler et al., 2017). Hasta el momento, en nuestro país, *E. canis* fue detectada en especímenes de *R. sanguineus s. l.* LTr de Formosa, pero no en especímenes de *R. sanguineus s. l.* LTe de Salta, Corrientes, Chaco, Misiones y Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Un estudio realizado en el año 2020 en nuestra provincia contrasta con lo publicado hasta el momento ya que todos los casos de ehrlichiosis monocítica canina notificados en Argentina se produjeron en zonas en las que *R. sanguineus*

s.l está ausente, y *R. sanguineus* s.s es endémico, éste último no se lo consideraba vector competente en la transmisión de *Ehrlichia canis*. En dicho estudio se analizó el vínculo epidemiológico entre la presencia de *R. sanguineus* sensu stricto y casos de ehrlichiosis monocítica canina producida por *E. canis*. Debido a la ausencia de *R. sanguineus* s.l “linaje tropical” en la provincia de Mendoza, se podría suponer que *R. sanguineus* s.s juega un papel en la transmisión natural de la enfermedad (Sebastian et al., 2021)

Otra investigación llevada a cabo en la provincia por Fantozzi en el año 2018 se detectó que más del 80% de las garrapatas halladas en perros de los diferentes departamentos de la provincia corresponden al género *R. Sanguineus*. (Fantozzi et al., 2018)

FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN EN PERROS

Esta enfermedad involucra acciones directas del patógeno y mecanismos indirectos secundarios de la respuesta inmune. Una vez producida la infección el período de incubación es de 2 a 3 semanas (Estrada-Cely & Espinosa-Núñez, 2013). La infección dentro del animal se disemina vía sanguínea o linfática dentro de las células mononucleares infectadas, llegando a otros sistemas orgánicos.

En el entorno experimental, después de un período de incubación de 8 a 20 días luego de la transfusión de sangre o la adherencia de la garrapata, el curso de la infección por *E. canis* se puede dividir secuencialmente en diferentes fases: Aguda (2 a 4 semanas de duración), subclínica (meses a años) y crónica. Se ha visto que la distinción entre estas fases no es sencilla en perros con enfermedad natural (“Recent advances in canine infectious diseases,” 2020) Los signos clínicos que se evidencian son: fiebre (o hipotermia en pacientes profundamente pancitopénicos), depresión o letargo, anorexia, linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia, palidez de las mucosas (Figura 1), alteraciones hematológicas y anomalías oculares (p. ej., uveítis anterior o posterior) son manifestaciones típicas de la EMC natural. Es probable que los perros con enfermedad aguda

estén infestados de garrapatas. También puede haber estomatitis y glositis necrótica, edema en extremidades posteriores y/o edema escrotal, y signos del sistema nervioso central como convulsiones, ataxia, disfunción vestibular y dolor cervical, han sido más frecuentes en la enfermedad crónica. La diátesis hemorrágica puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la crónica de la EMC, pero es más frecuente y grave en la fase crónica, y se manifiesta como petequias y equimosis cutáneas (Figura 2) y mucosas, epistaxis, hematuria, melena y sangrado prolongado en sitios de punción venosa.

En la fase subclínica de la enfermedad, las manifestaciones clínicas y/o o las anomalías hematológicas pueden estar ausentes o ser leves (esplenomegalia, fiebre intermitente, trombocitopenia, anemia) (Kelly, 2000)

Una proporción impredecible de perros infectados con *E. canis* progresará a la fase de enfermedad crónica, caracterizada por presentaciones clínicas variables, de las cuales un subconjunto tiene aplasia grave de la médula ósea (MO), pancitopenia profunda en sangre periférica y alta mortalidad debido a la septicemia, sangrado severo, aplasia medular, la cual no siempre afecta todas las líneas celulares y hasta el momento se desconoce el mecanismo fisiopatológico mediante el cual se afecta la médula ósea. Ocasionalmente, la mielosupresión puede desarrollarse sin signos premonitorios que indiquen las fases aguda y subclínica. Por lo tanto, los términos EMC "no mielosupresor" y "mielosupresor" pueden reflejar mejor la gravedad de la enfermedad en un contexto clínico, independientemente del inicio de la enfermedad o la fase supuesta. Significativamente, en algunas regiones endémicas de *E. canis*, como Grecia, Israel y Brasil, esta patología puede ser una de las principales causas de pancitopenia potencialmente mortal en perros. (Harrus & Waner, 2011)



Figura 1. Mucosas pálidas



Figura 2. Paciente con anticuerpos anti-ehrlichia con presencia de petequias y equimosis en abdomen

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE LINFOCITARIA ASOCIADA

La trombocitopenia es casi un factor constante en la infección por *Ehrlichia canis*, apareciendo a los 15-20 días post-infección y pudiendo persistir durante todas las fases de la enfermedad.

Las alteraciones hematológicas encontradas en pacientes positivos a presencia de anticuerpos anti *Ehrlichia spp.* del subconjunto de linfocitos se han caracterizado por una disminución de la relación CD4 +: CD8+. Desde el punto de vista de su diferenciación morfológica, se observan linfocitos atípicos caracterizados por la reducción de la relación núcleo-citoplasmática, desaparición de los nucléolos, maduración de la cromatina nuclear, desaparición de la basofilia citoplasmática y la aparición de la granulación inespecífica. (LeBlanc, 2009)

Con base en las definiciones estándar de la literatura de hematología, los linfocitos se dividen en linfocitos típicos y atípicos, y se definen los subgrupos de linfocitos atípicos de la siguiente manera: linfocitos binucleados, inmunoblastos, células plasmáticas, linfocitos plasmocitoides y linfocitos divididos. El linfocito típico tiene un citoplasma escaso y débilmente basófilo y un núcleo redondo o ligeramente dentado con cromatina condensada. Los inmunoblastos son linfocitos grandes con abundante citoplasma intensamente basófilo y núcleos grandes con cromatina granular reticular y, por lo general, uno o más nucléolos. La célula plasmática ha sido descrita como una célula de forma ovalada con un núcleo excéntrico, cromatina agrupada en grumos gruesos, una cantidad moderada de citoplasma fuertemente basófilo y una zona de Golgi menos basófila adyacente al margen del núcleo. (Bain, 2023)

Etapas intermedias entre los linfocitos pequeños y las células plasmáticas se denominan linfocitos plasmacitoides. Los linfocitos plasmacitoides son más grandes que los linfocitos típicos pequeños con aumento de citoplasma y basofilia citoplasmática, el núcleo es únicamente ligeramente excéntrico con cromatina agrupada irregularmente.

Los linfocitos atípicos existen en la sangre periférica cuando son estimulados por infecciones virales, determinadas bacterias, fármacos, señales inflamatorias o alérgenos. Los estudios han demostrado que los cambios específicos en el análisis de sangre periférica pueden predecir cambios morfológicos en las células sanguíneas. En publicaciones donde se asocia la revisión del extendido de sangre se identificó una población de linfocitos atípicos con núcleos angulares, múltiples nucléolos y citoplasma vacuolado, profundamente basófilo que tenía una tendencia a moldearse en las células circundantes. Estos cambios pueden verse secundarios a procesos reactivos inflamatorios crónicos o infecciosos. Estas anomalías morfológicas elevaron la sospecha de posible neoplasia linfoide, aunque estos cambios pueden verse secundarios a procesos reactivos como inflamatorios crónicos o infecciosos (Egenvall, Hedhammar, & Bjöersdorff, 1997)

Un estudio caracterizó los extendidos de sangre periférica en pacientes con ehrlichiosis infectados con *E. chaffeensis* o *E. ewingii* documentaron linfocitos atípicos, plegados, hipercromáticos núcleos que pueden confundirse con NK neoplásico o Células T similares a NK.

Los perros infectados naturalmente por *Anaplasma phagocitophylum* no se asociaron con linfocitosis, pero en el entorno experimental se asoció con linfocitosis leve (4500 células/l) durante recuperación de una fase aguda. Estos linfocitos se caracterizaron como blastos, en los cuales se observa un núcleo de mayor tamaño, cromatina inmadura, nucléolos prominentes y escasos gránulos citoplasmáticos.

Por el contrario, la linfocitosis es una característica notable de la infección crónica por *E. canis*. Numerosos estudios han demostrado que la infección natural por puede provocar linfocitosis, con valores de hasta 17 000 linfocitos/l, aunque no todas las series de casos describen linfocitosis (Avery & Avery, 2007).

Los informes anecdóticos y la experiencia de algunos médicos y patólogos clínicos sugieren que es posible contar con recuentos de linfocitos de hasta 30000 células/l en la infección por *E. canis* (Klein, Hu, Chao, & Goodman, 2000)

La respuesta de los linfocitos consiste en células con un fenotipo de linfocitos granulares grandes, que demostraron ser células T CD8+. Por lo tanto, parecería existir una relación entre la linfocitosis y la infección por *E. canis*. Los linfocitos reactivos se derivan de múltiples clones diferentes. Por lo tanto, el hallazgo de una población clonal homogénea de linfocitos por medio del ensayo PARR (reacción en cadena de la polimerasa para el reordenamiento de antígenos) junto con una expansión homogénea de linfocitos basada fenotipo inmunológico, es una fuerte evidencia de neoplasia. El ensayo PARR consiste en evaluar la clonalidad mediante la reacción en cadena de la polimerasa para el reordenamiento del receptor de antígeno, es un segundo paso útil en los casos en que los datos del fenotipo son equívocos, luego de haber realizado inmunotipificación mediante citometría de flujo para distinguir linfocitosis neoplásica, de no neoplásica. Hasta la fecha, los autores conocen una sola excepción a esta teoría. La infección por *E. canis* en perros puede causar no solo una expansión homogénea de las células T CD8 sino, en casos raros, una expansión clonal. Por lo tanto, en perros positivos para *E. canis*, la respuesta al tratamiento de la infección puede ser la mejor herramienta diagnóstica para determinar si la linfocitosis es atribuible a una infección o a una neoplasia maligna subyacente. Hasta el momento no se conoce como los microorganismos del género *Ehrlichia* spp. afectan la médula ósea.

Los linfocitos T están especializados en la destrucción de células infectadas por microorganismos intracelulares. Para su activación necesitan contactar con el antígeno que portan las células presentadoras de antígeno (monocitos y macrófagos) en su superficie. Para ello tiene un receptor antígeno-específico (TCR) como parte integrante de su membrana celular. El TCR se encuentra íntimamente vinculado a un complejo de péptidos transmembranosos denominado CD3. Una vez que el TCR se liga al antígeno, el CD3 es el encargado de activar a la célula.

El CD3 sólo se encuentra presente en los linfocitos T y es la molécula empleada para su identificación. Para reconocer el antígeno, los linfocitos T necesitan que éste sea presentado en la superficie de una célula acompañado de un marcador de superficie celular que informa al linfocito T de estar haciendo contacto con dicha célula. Estos marcadores celulares pertenecen a un importante grupo de

moléculas conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Gokce & Woldehiwet, 1999)

Existen dos tipos principales de CMH: el CMH de clase I y el de clase II. El CMH de clase I está presente prácticamente en todas las células nucleadas del organismo e interviene en el reconocimiento de los antígenos por parte de los llamados linfocitos T citotóxicos o Tc (linfocitos CD3+ CD8+).

La respuesta inmune celular es por excelencia el tipo de respuesta adecuada para microorganismos intracelulares como *Ehrlichia spp.* La respuesta humoral desencadenada durante la infección lejos está de colaborar en la resolución de la infección, ésta produce graves complicaciones. El Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) combinado con el IFN- γ , producido por los linfocitos T y las células NK, son indispensables en la protección frente a infecciones ehrlichiales.

En casos de ehrlichiosis crónica, la presencia del patógeno en los macrófagos puede modular la respuesta inflamatoria a través de citoquinas que potencialmente causarían efectos perjudiciales al hospedador, habiéndose sugerido que mucha de la sintomatología de la ehrlichiosis es más bien debida a la perturbación de los macrófagos que a los efectos directos de *Ehrlichia spp.*

Las citoquinas pueden tener un importante papel patogénico en la infección por *Ehrlichia spp.* Se ha demostrado que las células infectadas por el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana, producen citoquinas que actúan como potentes inhibidores de la proliferación de células madre de la médula ósea y pueden contribuir a las citopenias observadas en el curso de la infección (Castro, Machado, Tomaz De Aquino, Alessi, & Costa, 2004)

Poco se ha estudiado sobre la respuesta inmune de tipo celular en casos de ehrlichiosis canina y de otras especies. Parte de este hecho se ha debido a la dificultad en obtener anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos para linfocitos caninos. Actualmente el desarrollo de MAbs específicos para la diferenciación de antígenos leucocitarios en perros ha ayudado enormemente al estudio de la respuesta celular, así como al análisis detallado y a la clasificación histopatológica de las enfermedades linfoproliferativas.

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T, en el curso de la ehrlichiosis se ha observado una inversión del índice linfocitario CD4/CD8, debido a un incremento de los linfocitos T CD8+ y una disminución de los linfocitos CD4+. La inversión del índice CD4/CD8 sugiere una inmunoincompetencia que puede predisponer a los animales infectados a padecer otras enfermedades y, a su vez, otras enfermedades pueden hacerlos susceptibles al desarrollo de la fase crónica de la enfermedad (Frezoulis et al., 2017)

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la anamnesis (antecedentes de garrapatas, residencia o visitas a zonas endémicas), presentación clínica, y alteraciones hematológicas y bioquímicas. (S. Harrus & Waner, 2011)

Las técnicas diagnósticas tradicionales, como hematología, serología, citología (buffy coat) y diagnóstico molecular son herramientas diagnósticas valiosas, pero no concluyentes por sí solas. El examen hematológico es fundamental en correlación a la sinología clínica.

La trombocitopenia es el hallazgo hematológico más común en la ehrlichiosis aguda, y un aumento concurrente y significativo del volumen medio de plaquetas usualmente visto, refleja una trombopoyesis activa. También es común observar leucopenia y anemia moderada (normocítica, normocrómica, no regenerativa). La trombocitopenia severa, leucopenia y anemia se presentan más comúnmente durante la fase crónica de la ehrlichiosis canina.

La pancitopenia severa es la característica de la fase crónica grave. Las principales anomalías bioquímicas, son la hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia. Puede presentarse un aumento transitorio moderado en la actividad de la alanin aminotransferasa y de la fosfatasa alcalina. (S. Harrus & Day, 2001) El diagnóstico de enfermedades transmitidas por artrópodos representa un desafío sustancial para los veterinarios debido a signos clínicos similares y principalmente inespecíficos inducidos por varios patógenos transmitidos por vectores; además, las coinfecciones con dos o más patógenos pueden influir en los signos clínicos y los

cambios de laboratorio, lo que complica el diagnóstico, Diferentes técnicas que incluyen métodos indirectos (serología) o directos (p. ej., frotis de sangre, buffy coat y PCR) se utilizan como herramientas de diagnóstico. Las pruebas serológicas, se usan comúnmente para el diagnóstico. Sin embargo, la serología generalmente muestra reactividad cruzada entre patógenos estrechamente relacionados desde el punto de vista antigénico, y este método no diferencia entre la infección actual y la exposición previa a los agentes. Los métodos de detección directa, como el examen de frotis de sangre, a menudo muestran una sensibilidad limitada y poca especificidad, ya que no pueden identificar de manera confiable las especies, además de esto, el hallazgo de inclusiones intracelulares es difícil y requiere mucho tiempo.

Por el contrario, un enfoque molecular, es decir, PCR, es un ensayo más sensible y específico que los demás debido a su capacidad para distinguir entre especies de patógenos estrechamente relacionados y para revelar las infecciones actuales. Los resultados positivos de la PCR confirman la infección, y una mayor caracterización molecular permite la comparación de cepas de diferentes regiones del mundo (Heeb, Wilkerson, Chun, & Ganta, 2003)

En el extendido sanguíneo el objetivo es la evaluación microscópica de cuerpos de inclusión, resulta una técnica difícil y lleva mucho tiempo, sin embargo, aproximadamente, solo en un 4% de los casos agudos es posible demostrar la mórula intracitoplasmática de *E. canis*, hay que tener en cuenta que esta técnica es dependiente de la experiencia del personal que la realiza.

Las técnicas serológicas son las pruebas diagnósticas más utilizadas ante una infección por *Ehrlichia spp.* Estas técnicas no detectan el organismo causal, sino anticuerpos producidos frente a éste, por lo tanto, podemos tener falsos negativos porque al momento de la prueba no hubo seroconversión o falsos positivos ya que pueden existir anticuerpos por exposición anterior con el patógeno. Para este tipo de prueba se utilizan kits comerciales que mediante cromatografía detectan anticuerpos, estas tienen una sensibilidad del 95% y una especificidad del 94,6% respecto a la prueba de inmunofluorescencia indirecta. La prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos IgG anti- *E. canis* se considera el "estándar de oro" serológico, que indica exposición

a *E. canis*. Ig M no se considera un indicador confiable de exposición a *E. canis* debido al desarrollo inconsistente de anticuerpos IgM en el curso de la enfermedad

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es otra técnica utilizada para el diagnóstico de esta patología, permite detectar el ADN de la bacteria en la muestra de sangre del paciente, en animales reservorios y en garrapatas, mientras que la secuenciación confirma o determina la especie infectante. Debido a su alta sensibilidad, permite el diagnóstico temprano del agente, antes de que se desarrollen los anticuerpos. La PCR y la secuenciación son métodos sensibles para detectar y caracterizar el ADN de *E. canis*. Pueden producirse resultados falsos positivos con temperaturas de hibridación relativamente bajas, cuando hay contaminantes presentes o cuando se produce una amplificación no específica. Un resultado de PCR negativo indica que no se detectó ADN objetivo, pero no prueba necesariamente que no hubiera ADN presente en la muestra (resultado falso negativo). La detección del ADN de *E. canis* puede lograrse entre 4 y 10 días después de la inoculación. En base a todo esto, la bibliografía sugiere que el recuento de plaquetas y su magnitud se utilicen como prueba de detección de EMC en regiones endémicas, mientras solo el 1,4% de perros no trombocitopenicos dieron positivos para ADN de *E. canis* (16s rARN) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 21% de perros con recuento plaquetarios entre 100.000 y 200.000/LL, y el 63% de perros con recuentos plaquetarios menores a 100.000/LL dieron positivos por PCR para *E. canis*. Esto pone en evidencia la importancia del recuento plaquetario en perros sospechosos (Feng & Walker, 2004)

TRATAMIENTO

Las tetraciclinas son los antibióticos de elección para el tratamiento de ehrlichiosis. Son agentes antibacterianos que actúan inhibiendo la unión de aminoacil-tRNA al ribosoma bacteriano durante la síntesis de proteínas. La doxiciclina es el fármaco de primera línea para la ehrlichiosis canina, en 48 horas luego de iniciado en tratamiento devuelve a las células la acción de fagocitar y

también actúa como inmunomodulador. Actualmente se recomienda el uso durante al menos 4 semanas de 10mg/kg/día o fraccionado en 2 dosis a 5mg/kg cada 12hs. La combinación de tetraciclinas con dipropionato de imidocarb aumenta la eficacia del tratamiento, con el valor añadido de que es efectivo en caso de co-infección con *Babesia spp.* Sin embargo, hay resultados discrepantes en cuanto a la eliminación de la infección tras la utilización de los regímenes de doxiciclina recomendados, este tipo de tratamiento elimina el ADN del patógeno de sangre, médula ósea, bazo, hígado y pulmones, pero si se detectó ADN en el vector que se alimentó de animales en tratamiento, lo que sugiere la persistencia de la infección (Qurollo et al., 2013)

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la morfología y morfometría de linfocitos presentes en extendidos sanguíneos de perros que poseen anticuerpos anti-*Ehrlichia spp.*

Objetivos específicos

- Descripción morfológica del núcleo y citoplasma de los linfocitos observados al extendido sanguíneo y en capa leucocitaria de perros con presencia de anticuerpos anti- *Ehrlichia spp.*
- Describir la morfometría de linfocitos presentes en extendidos de perros con anticuerpos anti- *Ehrlichia spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 10 muestras sanguíneas de perros, remitidas espontáneamente por veterinarios clínicos a un laboratorio privado, con solicitud de hemograma y serología de *Ehrlichia spp.* Los extendidos sanguíneos se fijaron con metanol durante 5 minutos y fueron teñidos con

solución Giemsa al 10% durante 30 minutos. Posteriormente se evaluaron al microscopio con el objetivo de inmersión (100x) múltiples áreas aleatorias de la monocapa y cola del frotis. También se realizó extendido de la capa leucocitaria, la cual se obtiene del estrato que queda por encima de los glóbulos rojos luego de realizar un micro hematocrito, en aquellas muestras que resultaron positivas a la prueba de detección de anticuerpos anti-*Ehrlichia spp.* y en aquellos extendidos donde se hallaron mórulas afectando monocitos se midieron un total de 96 linfocitos de las diferentes muestras en microscopio óptico al cual se le acopló un micrómetro calibrado. Se tomaron imágenes y se analizaron con el programa Image J FIJI®. Se midieron diámetro del núcleo y citoplasma de los linfocitos observados. También se analizaron la relación diámetro núcleo/ citoplasma y se describieron las características fenotípicas del núcleo y citoplasma de dichas células. Esta relación se obtiene realizando la división entre el radio medio del núcleo y el radio medio del citoplasma. Radio Medio del Citoplasma = \sum radios del citoplasma/Nr (promedio de todos sus radios).

RESULTADOS

De los 96 linfocitos observados de 10 extendidos sanguíneos y de capas leucocitarias de perros con presencia de anticuerpos anti-*ehrlichia spp.*, o con presencia de mórulas en los monocitos, la media del diámetro de los citoplasmas linfocitarios fue de $9,72 \mu\text{m} \pm 1,31$ (valor máx. 11,92; valor mín. $7,27 \mu\text{m}$), y la media del núcleo fue de $8,53 \mu\text{m} \pm 1,30$ (valor máx. 11,18; valor mín. $6,58 \mu\text{m}$) (Figura 3) La relación núcleo citoplasma fue de $0,874 \pm 0,9$ (valor máx 0,996; valor mín. 0,65).

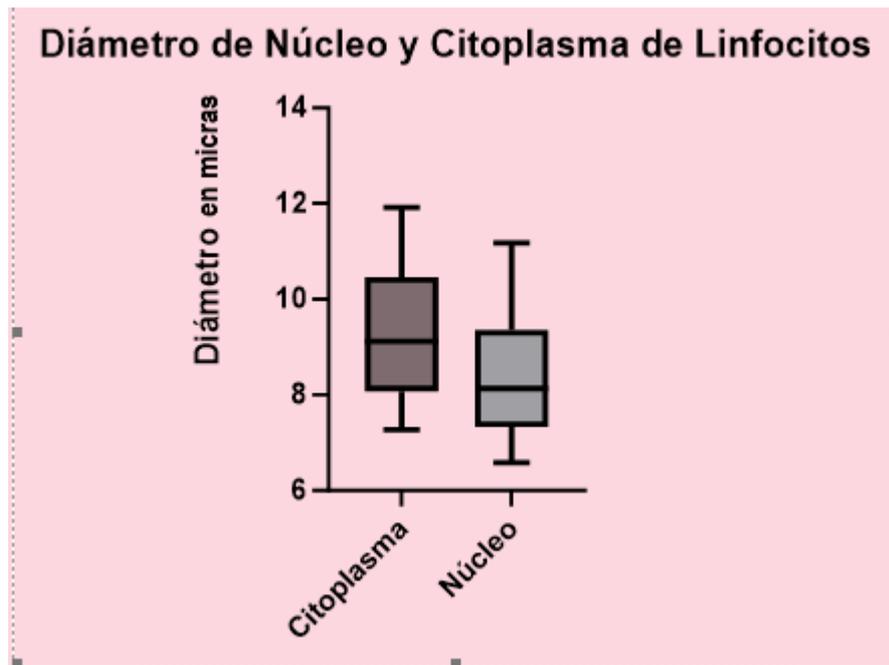


Figura 3. Gráfico de media, rango y desviación estándar del diámetro de núcleo y citoplasma de linfocitos de perros con inmunoglobulinas anti-*Ehrlichia* spp.

Respecto a la caracterización microscópica de los linfocitos atípicos (Figura 4), se observó la presencia de 51% de linfocitos con núcleos redondos (Figura 5), 5,8 % de linfocitos indentados (Figura 6), 52,6% con cromatina densa (Figura 7) y 47,3% con cromatina laxa (Figura 5), (n=96). Se observaron además nucléolos prominentes (de 1 a 3 por núcleo) (Figura 8), y citoplasma basófilo claro en el 37% (Figura 9) de los linfocitos observados (n=96)

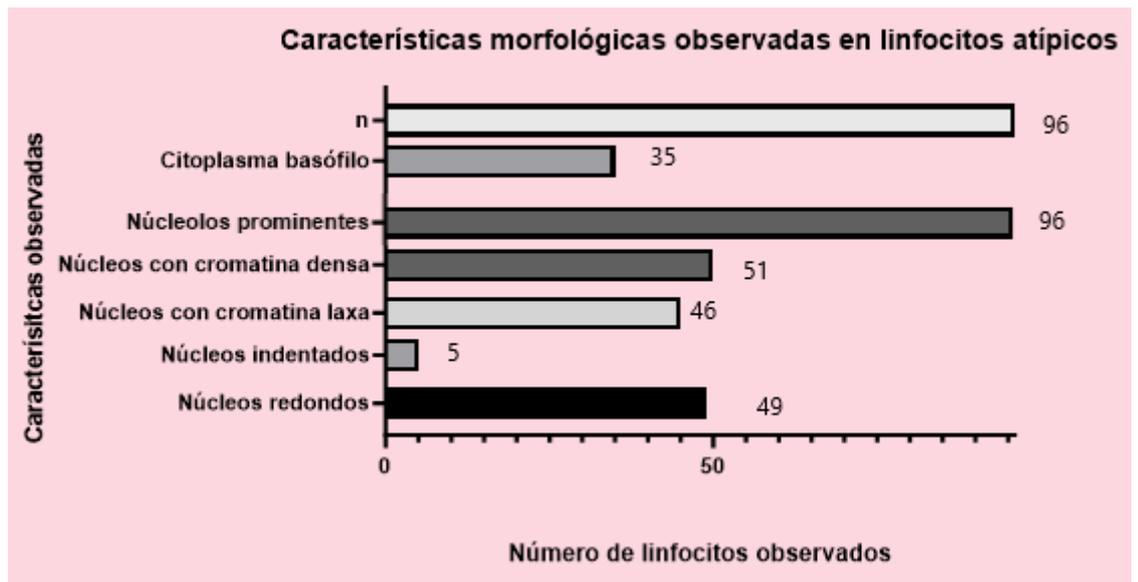


Figura 4. Gráfico de características cualitativas observadas en linfocitos

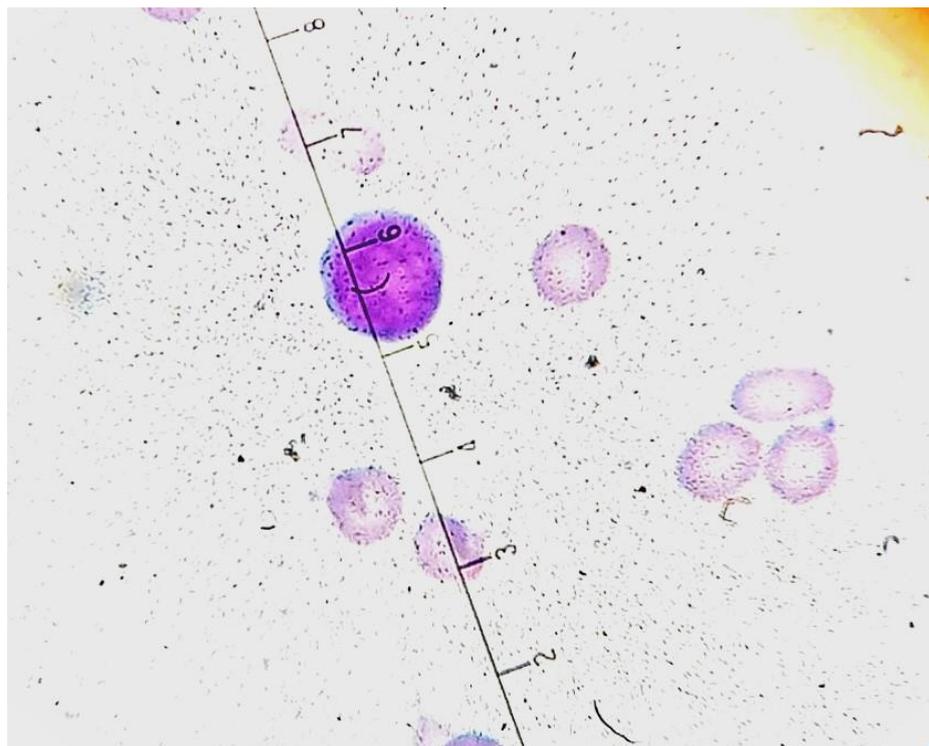


Figura 5. Extendido sanguíneo con imagen de linfocito con núcleo redondo y cromatina laxa.



Figura 6. Linfocitos en extendido de capa leucocitaria.

Flecha roja: linfocito con núcleo indentado. **Flecha azul:** linfocito reactivo

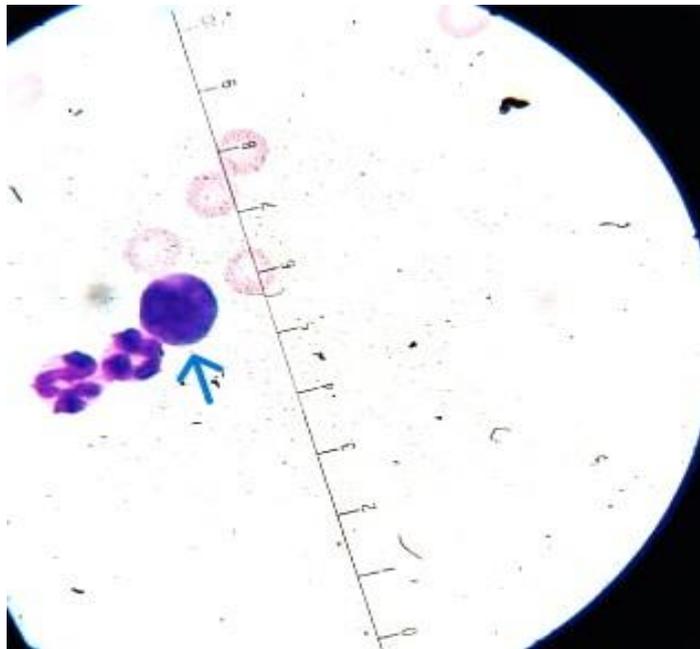


Figura 7. Extendido sanguíneo. La flecha indica un linfocito con núcleo con cromatina

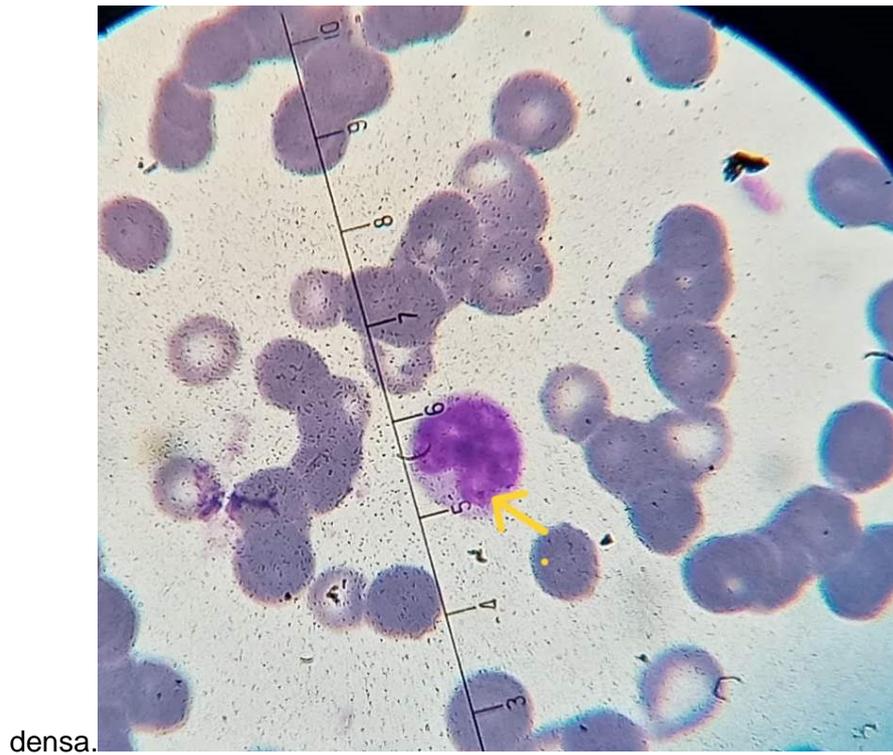


Figura 8. Extendido sanguíneo. La flecha indica un linfocito con nucléolos prominentes.

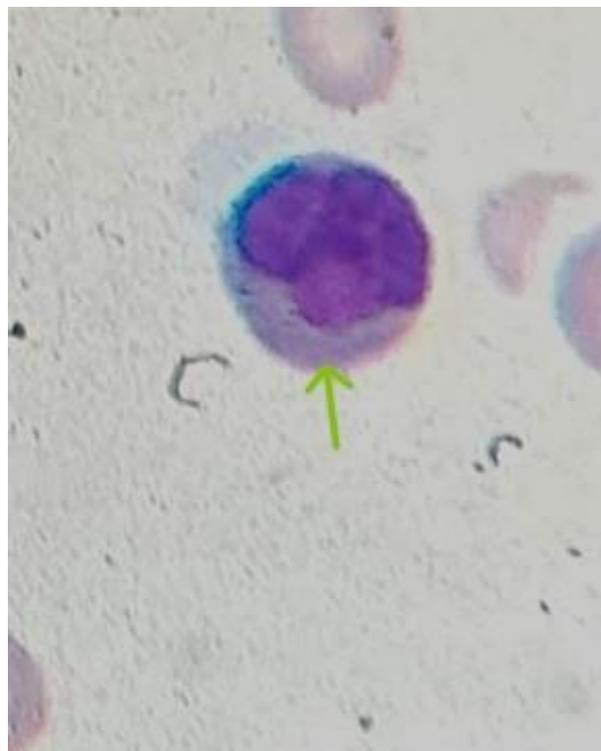


Figura 9. Extendido sanguíneo. La flecha indica un linfocito con citoplasma basófilo.

DISCUSIÓN

La presencia de linfocitos atípicos en perros con ehrlichiosis ha sido descrita en la literatura por algunos autores, las atipias en linfocitos fueron comparadas con atipias similares a las producidas por enfermedades con diferentes grados de malignidad, como los linfomas. En un estudio realizado en el extendido sanguíneo de un paciente humano con serología positiva a *Ehrlichia ewingii* y *E. Chaffeensis*, se documentó linfocitos granulares grandes prominentes, con núcleos atípicos plegados e hipercromáticos que pueden confundirse con células “natural killer” neoplásicas o (Shimon Harrus & Waner; 2011; Qurollo et al., 2013).

En el presente estudio se analizó la morfología y morfometría de linfocitos en perros con serología positiva a *Ehrlichia spp.* Por lo anterior, podemos inferir que los caninos incluidos en este estudio, corresponden a animales que han sido expuestos al patógeno, ya que la presencia de anticuerpos es sugerente de exposición al mismo. Son escasos los reportes acerca de las modificaciones morfológicas de linfocitos en perros afectados por *Ehrlichia spp.* Por otro lado, los reportes que describen alteraciones en linfocitos son estudios de casos puntuales (Shimon Harrus & Waner, 2011; Feng & Walker, 2004). Mylonakis describe la ausencia de linfocitosis, así como de linfocitos atípicos en perros infectados experimentalmente con *Ehrlichia canis* durante los primeros 45 días post infección (Gianopoulos, Mylonakis, Theodorou, & Christopher, 2016). En concordancia con la descripción morfológica realizada por Heeb, (Heeb, Wilkerson, Chun, & Ganta, 2003) los linfocitos hallados presentaban gránulos azurófilos en su citoplasma. En nuestro estudio pudimos observar linfocitos con citoplasma basófilo. Además, la mayoría de los linfocitos observados presentaron núcleos con nucléolos prominentes y cromatina de densa (Feng & Walker, 2004)

En los linfocitos observados, hallamos que un 37% evidencia la presencia de nucléolos prominentes. En la literatura se habla de una mayor proporción de linfocitos “grandes” en perros con ehrlichiosis, pero sin aclarar el tamaño ni el porcentaje exactos de los mismos (Shimon Harrus & Waner, 2011). En nuestro

trabajo hallamos un 52,03% de linfocitos superan el diámetro de referencia el cual es de 7-9 micras. Además, coincidimos en que un 52,6% de las células estudiadas presentaban núcleos con cromatina densa y nucléolos prominentes (Feng & Walker, 2004). No existen, para nuestro conocimiento, estudios que mesuraran los valores de diámetro de núcleo y citoplasma de linfocitos, lo cual es de gran relevancia a la hora de comparar estudios, para comprender la importancia de la presencia de linfocitos atípicos en ehrlichiosis, ya que las anomalías morfológicas hacen sospechar de una posible neoplasia linfoide, o ser secundarios a una neoplasia reactiva (Qurollo et al., 2013)

Respecto a la relación núcleo-citoplasma, la cual se considera que al aumentar dicha relación explicaría la inmadurez celular, excepto en los linfocitos en los cuales a pesar de ser células maduras esta relación se mantiene elevada. En nuestro trabajo pudimos obtener un valor de $0,874 \pm 0,9$ (valor máx 0,996; valor mín. 0,65). La misma no está descrita en la bibliografía para caninos.

Por lo expuesto, este trabajo es para nuestro conocimiento, el primer estudio en describir la morfometría de linfocitos en perros infectados crónicamente por *Ehrlichia spp.*

CONCLUSIÓN

- Estos resultados representan para nuestro conocimiento los primeros en describir con exactitud la morfometría de linfocitos atípicos en pacientes caninos con anticuerpos anti-*Ehrlichia spp.*
- En concordancia con los escasos estudios publicados, la presencia de linfocitos atípicos se presentaría predominantemente en pacientes con presencia de anticuerpos anti- *Ehrlichia spp.*
- En particular el dato de la relación núcleo/citoplasma no estaba presente en la literatura y representa información relevante para la aproximación diagnóstica de esta patología.

- La información obtenida en este trabajo también colaboraría como aproximación al diagnóstico de la enfermedad.
- Los datos fenotípicos de los linfocitos atípicos concuerdan con los descritos por otros autores.

BIBLIOGRAFÍA (según normas APA)

- Avery, A. C., & Avery, P. R. (2007). Determining the significance of persistent lymphocytosis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 37(2), 267–282, vi.
- Bain, B. J. (2023). Blood cells 3E: Morphology & clinical Relevance GulatiG and CaroJ. American society for clinical pathology (ASCP) press, 2021. ISBN-13: 978-089189-6791. *British Journal of Haematology*, 200(1), 113–113. doi:10.1111/bjh.18482
- Cardozo, G. P., Santos, E. V., Fachin, A. L., França, S. C., & Marins, M. (2011). A glass bead protocol for recovery of host cell free *Ehrlichia canis* and quantification by Sybr-green real-time PCR. *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. Al*, 35(1), 35–36.
- Castro, D., Machado, M. B., Tomaz De Aquino, R. Z., Alessi, L. P. C., & Costa, A. C. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol*, 119, 73–86.
- Chitimia-Dobler, L., Langguth, J., Pfeffer, M., Kattner, S., Küpper, T., Friese, D., ... Nava, S. (2017). Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences. *Veterinary Parasitology*, 239, 1–6. doi:10.1016/j.vetpar.2017.04.012
- Cicuttin, G. L., De Salvo, M. N., & Gury Dohmen, F. E. (2016). Molecular characterization of Ehrlichia canis infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 954–957. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.04.017
- de Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E. B., & Otranto, D. (2011). Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 206–212.

- Egenvall, A. E., Hedhammar, A. A., & Bjöersdorff, A. I. (1997). Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *The Veterinary Record*, 140(9), 222–226. doi:10.1136/vr.140.9.222
- Estrada-Cely, G. E., & Espinosa-Núñez, A. C. (2013). *Retrospective study of canine Ehrlichiosis in the city of Cali - Valle del Cauca , during 2013 - Estudio clínico retrospectivo de Ehrlichiosis em caninos na cidade de Cali - Valle del Cauca durante o ano.* 1–9.
- Fantozzi, M. C., Linares, M. C., Cuervo, P. F., Romoli, A., Vittaz, D., & Mera Y Sierra, R. (2018). Especies de garrapatas (Acari: Ixodidae) parásitas de perros (*Canis familiaris*) en zonas urbanas del Gran Mendoza, Argentina. *FAVE. Seccion ciencias veterinarias*, 17(1), 25–29. doi:10.14409/favecv.v17i1.7437
- Feng, H.-M., & Walker, D. H. (2004). Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis. *Infection and Immunity*, 72(2), 966–971. doi:10.1128/IAI.72.2.966-971.2004
- Frezoulis, P. S., Angelidou, E., Karnezi, D., Oikonomidis, I. L., Kritsepi-Konstantinou, M., Kasabalis, D., & Mylonakis, M. E. (2017). Canine pancytopenia in a Mediterranean region: a retrospective study of 119 cases (2005 to 2013). *The Journal of Small Animal Practice*, 58(7), 395–402. doi:10.1111/jsap.12647
- Gianopoulos, A., Mylonakis, M. E., Theodorou, K., & Christopher, M. M. (2016). Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(2), 281–290. doi:10.1111/vcp.12359
- Gokce, H. I., & Woldehiwet, Z. (1999). Lymphocyte responses to mitogens and rickettsial antigens in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*. *Veterinary Parasitology*, 83(1), 55–64. doi:10.1016/s0304-4017(99)00050-3
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., & Kopáček, P. (2013). Interaction of the tick immune system with

transmitted pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00026

- Harrus, S., & Day, M. (2001). Presence of immunocomplexes, and absence of antinuclear antibodies in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol [Internet]*, 83(4), 343–349.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnóstico de ehrlichiosis monocitotrófica canina (*Ehrlichia canis*): una descripción general. *Veterinario. J*, 187, 292–296. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001
- Harrus, Shimon, & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 187(3), 292–296. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001
- Heeb, H. L., Wilkerson, M. J., Chun, R., & Ganta, R. R. (2003). Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(4), 379–384. doi:10.5326/0390379
- Kelly, P. J. (2000). Canine ehrlichioses : an update : review article. *Journal of the South African Veterinary Association [Internet]*, 71(2).
- Klein, M. B., Hu, S., Chao, C. G., & Goodman, J. L. (2000). The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J Infect Dis*, 41(6), 263–265.
- LeBlanc, C. J. (2009). Fundamentals of veterinary clinical pathology, 2nd edition. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(1), 131–131.
- Lv, J., Gao, M., Zong, H., Ma, G., Wei, X., & Zhao, Y. (2020). Application of peripheral blood lymphocyte count in prediction of the presence of atypical lymphocytes. *Clinical Laboratory*, 66(6). doi:10.7754/Clin.Lab.2019.191113

- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F. A., Richtzenhain, L. J., & Labruna, M. B. (2011). Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*, 117(1), 51–55.
- Moumène, A., & Meyer, D. F. (2016). Ehrlichia's molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes and Infection*, 18(3), 172–179. doi:10.1016/j.micinf.2015.11.001
- Nelson, R. W., & Couto, C. G. (2005). *Manual of small animal internal medicine* (2a ed.). St. Louis, MO: Mosby.
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3(1), 2.
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., ... Raoult, D. (2014). Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1), 166–166. doi:10.1128/cmr.00104-13
- Procajlo, A., Skupień, E. M., Bladowski, M., & Lew, S. (2011). Monocytic ehrlichiosis in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(3), 515–520. doi:10.2478/v10181-011-0077-9
- Qurollo, B. A., Davenport, A. C., Sherbert, B. M., Grindem, C. B., Birkenheuer, A. J., & Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection with Panama Mountain Ehrlichia sp. in a dog with atypical lymphocytes and clonal T-cell expansion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 1251–1255. doi:10.1111/jvim.12148
- *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*. (2016). 28, 641–665.
- Rikihisa, Y. (2006). Ehrlichia subversion of host innate responses. *Current Opinion in Microbiology*, 9(1), 95–101. doi:10.1016/j.mib.2005.12.003

- Rikihisa, Y. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(5), 328–339. doi:10.1038/nrmicro2318
- Sanches, G. S., de Oliveira, P. R., André, M. R., Machado, R. Z., Bechara, G. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2012). Copulation is necessary for the completion of a gonotrophic cycle in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Journal of Insect Physiology*, 58(7), 1020–1027. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.006
- Sebastian, P. S., Flores, F. S., Saracho-Bottero, M. N., Tarragona, E. L., Venzal, J. M., & Nava, S. (2020). Molecular detection of rickettsial bacteria in ticks of the genus *Ixodes* from the Southern Cone of America. *Acta Tropica*, 210(105588), 105588. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105588
- Sebastian, P. S., Mera y Sierra, R., Neira, G., Hadid, J., Flores, F. S., & Nava, S. (2021). Epidemiological link between canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* and the presence of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto in Argentina. *Parasitology Research*, 120(2), 725–729. doi:10.1007/s00436-020-07005-7
- Straube, J. (2010). *Canine Ehrlichiosis - from Acute Infection to Chronic Disease*. Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health. Germany.
- Villaescusa, A., Tesouro, M. A., García-Sancho, M., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., & Sainz, A. (2012). Evaluation of lymphocyte populations in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* with and without clinical signs. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5–6), 279–282. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.10.034
- Zhang, J.-Z., Popov, V. L., Gao, S., Walker, D. H., & Yu, X.-J. (2007). The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. *Cellular Microbiology*, 9(3), 610–618. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00812.x