Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile

Javier López, Katia Abarca, M. Isabel Mundaca, Carla Caballero y Fernando Valiente-Echeverría

Molecular identification of *Ehrlichia canis* in a dog from Arica, Chile

We report a molecular confirmed case of canine ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. A 10-year old female crossbred Siberian from the city of Arica, which was infested by ticks, presented hemorrhagic manifestations (hematomas and snout bleeding) and prostration. Blood cell count revealed thrombocytopenia (30,000 platelets/mm³). Immunochromatographic rapid testing for *E. canis* IgG was positive. Amplification and sequencing of a fragment of the 16S rRNA gen from a blood sample showed 100% homology with *E. canis* from Perú. This is the first report of *E. canis* in Chile, an agent with known zoonotic potential.

Key words: *Ehrlichia canis*, canine ehrlichiosis, zoonoses, pet related infections.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, ehrlichiosis canina, zoonosis, infecciones relacionadas a mascotas.

Hospital Veterinario Puente Alto, Santiago, Chile (JL).
Pontificia Universidad Católica de Chile.
Facultad de Medicina
Laboratorio de Infectología y Virología Molecular (KA, FV).
Centro Veterinario Arica (MIM, CC).

Los autores declaran no tener conflicto de interés
Financiamiento:
CONICYT/FONDECYT/Regular 1100809

Recibido: 6 de julio de 2011
Aceptado: 28 de junio de 2012

Correspondencia a:
Katia Abarca Villaseca
katia@med.puc.cl

Introducción

Las infecciones transmitidas por garrapatas constituyen un tema emergente de creciente interés mundial, en particular aquellas relacionadas a mascotas, por su estrecho contacto con las personas. Entre ellas destacan las ehrlichiosis, infecciones causadas por agentes de la familia *Anaplasmataceae*, siendo *Ehrlichia chaffeensis* y *Anaplasma phagocytophilum* las principales causantes de cuadros clínicos en humanos (ehrlichiosis monocítica y granulocítica humana, respectivamente).

En caninos, el agente más importante corresponde a *Ehrlichia canis*, causante de la ehrlichiosis monocítica canina, con presentación aguda, subaguda y crónica^{1,2}. Es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata café del perro^{3,4}, la principal garrapata canina presente en distintas regiones de Chile⁵. Los hallazgos hematológicos más relevantes de la ehrlichiosis monocítica canina incluyen anemia no regenerativa, trombocitopenia, leucopenia, presencia de mórulas en monocitos y, con cierta frecuencia, compromiso de las tres series hematológicas^{1,2}. Su distribución es mundial y muy similar a la de su vector *R. sanguineus*, predominando en áreas tropicales y subtropicales².

El rol zoonótico de *E. canis* ha sido confirmado en Venezuela, país donde fue inicialmente aislada de sangre de un adulto asintomático⁶, posteriormente se comprobó la similitud molecular de este aislado con otros provenientes de perros y garrapatas⁷ y, más recientemente, se reportó la identificación molecular de *E. canis* en sangre de personas con síntomas clínicos compatibles con ehrlichiosis monocítica humana⁸.

En Chile, la ehrlichiosis canina se reportó por primera

vez en la comuna de Puente Alto en el año 1999; siendo inicialmente atribuida a *E. canis* por estudios serológicos⁹. Estudios moleculares posteriores realizados en perros sintomáticos de la Región Metropolitana demostraron la presencia de *Anaplasma platys*, sin encontrarse infecciones por *E. canis*¹⁰. Si bien, algunos estudios serológicos demuestran presencia de anticuerpos séricos en personas^{11,12}, el rol de *A. platys* como patógeno en humanos no ha sido aún aclarado.

Reportamos el primer caso de ehrlichiosis canina por *E. canis* en Chile, confirmado por técnicas moleculares, ocurrido en un perro de la ciudad de Arica.

Caso clínico

Se trata de un canino hembra de 10 años, mestizo siberiano, con antecedentes de infestación frecuente por garrapatas, proveniente de la ciudad de Arica, ciudad fronteriza con Perú. Presentaba cuadro de seis semanas de evolución con compromiso del estado general y anorexia, al que se sumó en el último mes sangrado bucal; la sintomatología no mejoró tras una terapia inicial con vitamina B y antimicrobianos (metronidazol y espiramicina). Sus dueños consultaron a un veterinario para solicitar su eutanasia debido a su deterioro progresivo. Al examen físico destacaban su decaimiento, palidez de las membranas mucosas, debilidad extrema, emaciación, sangrado gingival y hematomas múltiples.

Previo a la eutanasia se obtuvo una muestra de sangre para estudio, por sospecha clínica de ehrlichiosis. En los exámenes generales destacaba trombocitopenia de 30.000 plaquetas/mm³, (valores normales para caninos 150.000 a 500.000/mm³), anemia leve con hematocrito

Tabla 1. Comparación nucleotídica del gen 16S ARNr para diferentes cepas de *Ehrlichia canis*

Cepa de <i>Ehrlichia canis</i>	Posición nucleotídica ^a				
	61	94	130	165	192
Arica ^b	A	G	A	T	A
PDE ^c	•	•	•	•	•
VDE ^d	•	•	•	C	•
VHE ^e	•	•	•	C	•
Oklahoma ^f	•	-	•	C	•
Florida ^g	•	-	•	C	•
611 (Israel) ^h	•	•	•	C	C
GZh982 ⁱ	-	•	•	C	•
Germishuys ^j	•	•	•	C	•
Gxht67 ^k	•	•	G	C	•
Gdt3 ^l	•	•	•	C	•
Madrid ^k	•	•	•	C	•
Kagoshima ^l	•	•	•	C	C
Turkey ^m	•	•	•	C	•
Greece ⁿ	•	•	•	C	•
TWN1 ^o	•	•	•	C	•
ECAN ^p	•	•	•	C	•
Ovina ^q	•	•	•	C	•

^aPuntos negros representan las posiciones conservadas en relación a la secuencia obtenidas desde el aislado de Arica (-) indica delección nucleotídica. ^b*E. canis* desde ADN de perro en Chile reportado en este estudio. ^c*E. canis* desde ADN de perro en Perú (15). ^d*E. canis* desde ADN de perro en Venezuela (7). ^eAislado de cultivo humano en Venezuela (8). ^f*E. canis* aislado de cultivo de perro en Oklahoma (16). ^g*E. canis* aislado de cultivo de perro en Florida (16). ^h*E. canis* aislado de cultivo de perro en Israel (17). ⁱ*E. canis* desde ADN de perro en China (18). ^j*E. canis* desde ADN de oveja en Sudáfrica (19). ^k*E. canis* desde ADN de perro en España (20). ^l*E. canis* desde ADN de perro en Kagoshima, Japón (21). ^m*E. canis* desde ADN de perro en Turquía. ⁿ*E. canis* desde ADN de perro en Grecia. ^o*E. canis* desde ADN de perro en Taiwán. ^p*E. canis* desde ADN de perro en Tailandia. ^q*E. canis* desde ADN de oveja en Turquía (22).

32% y Hb 10,5 mg/dL, (valores normales para caninos Hto 37-55%, Hb 12-19,2 mg/dL), recuento de leucocitos de 8.000/mm³ (valores normales para caninos 6.000 a 17.400/mm³) y un discreto aumento de creatininemia y nitrógeno ureico. Se efectuó determinación de IgG anti-*E. canis* y anti-*A. phagocytophilum* mediante kit rápido inmunocromatográfico (SNAP 3Dx Plus Test, Idexx®, USA), ensayo que ha reportado una sensibilidad de 79,2% (IC 64,5-88,9), especificidad de 100% (IC 89,8-100) y una precisión de 89,3% comparada con la inmunofluorescencia como estándar de oro¹³. El suero del canino mostró un resultado positivo para *E. canis* y negativo para *A. phagocytophilum*.

Se extrajo ADN desde la muestra de sangre utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Se realizó RPC utilizando los partidores EHR-OUT1 y

EHR-OUT2¹⁴ que amplifican el gen 16S ARNr de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. La amplificación se realizó mediante el método de “touch down PCR”, que consiste en 14 ciclos de denaturación por 30s a 95°C, anillamiento por 30s a 74,4°C (decreciendo la temperatura 0,5°C por ciclo) y extensión por 90s a 72°C¹⁴. Luego 19 ciclos de denaturación por 30s a 95°C, anillamiento por 30s a 67,4°C y extensión por 90s a 72°C, para terminar con una extensión final de 300s a 72°C utilizando 2,5 µL de ADN en un volumen final de reacción de 25 µL. El fragmento obtenido de aproximadamente 1.000 pares de bases se sometió a una nueva amplificación por RPC anidada utilizando partidores internos específicos para *Ehrlichia* spp GE2F y EHRL3-IP2¹⁴. Para ello se utilizó 1 µL de la reacción anterior en un volumen final de 25 µL. La amplificación consistió en 35 ciclos de denaturación por 30 s a 95°C, anillamiento por 30 s a 50°C y extensión por 30 s a 72°C, para terminar con una extensión final de 300 s a 72°C. Se obtuvo la banda esperada de 120 pares de bases, que sugiere la presencia de *Ehrlichia* spp. Para identificar la especie de *Ehrlichia* se secuenció el producto de la primera RPC con el partidore reverso EHR-OUT2 obteniendo un fragmento de 210 pares de bases. Esta secuencia mostró homología de 100% con la cepa de *E. canis* (DQ915970.1) reportada en Perú en el año 2007¹⁵ (Tabla 1). Se construyó un árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr utilizando el método del vecino más próximo (*Neighbor-Joining*); la matriz de distancia se calculó a través del método Kimura (*two-parameter*) con un análisis de confianza (*bootstrap*) de 1.000 repeticiones (Figura 1). El árbol filogenético se realizó utilizando el software MEGA 4.0²³.

Discusión

Se documenta por primera vez la presencia de *E. canis* en Chile, específicamente en la ciudad de Arica. Es altamente probable que este hallazgo esté en relación con la presencia de este agente ehrlichial en Perú, país limítrofe a esta ciudad y donde fue identificado hace algunos años en perros sintomáticos e infestados por garrapatas¹⁵. El libre tránsito de caninos entre ciudades y localidades cercanas a la frontera muy probablemente ha permitido el ingreso de este agente a nuestro país y su establecimiento pudo haberse visto facilitado por la presencia del vector en la ciudad. Si bien la literatura científica chilena indica la presencia de *R. sanguineus* entre las regiones de Valparaíso y el Maule⁵, es bien reconocido, tanto por los médicos clínicos como por la población, que esta garrapata se encuentra presente en la mayoría del territorio nacional, incluyendo la zona de Arica. Recientes estudios realizados en esta región corroboran esta información (Abarca, datos no publicados). Factores climáticos podrían también haber contribuido al

establecimiento de *E. canis* en Arica, pues esta especie tradicionalmente ha sido descrita en climas tropicales y subtropicales², como el que presenta esta ciudad.

Es importante destacar que a diferencia de Arica, en estudios realizados en la Región Metropolitana no se ha encontrado *E. canis* sino *A. platys*^{10,24}. Si bien ambos agentes son causantes de cuadros hemorrágicos asociados a trombocitopenia y transmitidos por la garrapata café del perro, existen algunas diferencias hematológicas, las que se han podido observar en estas dos ciudades. En 30 casos de ehrlichiosis canina analizados en la Región Metropolitana, el compromiso hematológico se limitó al plaquetario, presentándose ocasionalmente anemia secundaria a hemorragias, sin observarse leucopenia ni pancitopenia²⁵, hallazgos que son muy frecuentes en la infección por *E. canis*². En cambio, en 31 casos de ehrlichiosis canina estudiados en la ciudad de Arica, se observó leucopenia en 24 y pancitopenia en 22 animales²⁶.

Si bien los test serológicos pueden ser de gran ayuda para los médicos clínicos al apoyar una sospecha diagnóstica, es relevante conocer sus limitaciones. En el caso de las infecciones por *Ehrlichia*, además de las frecuentes reacciones cruzadas observadas entre especies relacionadas¹, la utilidad del examen puede variar considerablemente en distintas regiones geográficas, según la especie presente en cada sitio. Este aspecto se ilustra claramente al analizar la información disponible en nuestro país. La positividad del test inmunocromatográfico rápido para *E. canis* en el caso que reportamos es concordante con la confirmación molecular de dicha especie en este animal. Asimismo lo es la positividad del examen en 29/31 caninos estudiados previamente en la misma ciudad²⁶ y su negatividad en 120 caninos de la Región Metropolitana²⁴. Estos antecedentes sugieren que dicho test puede ser de utilidad para apoyar una sospecha clínica de ehrlichiosis canina en la ciudad de Arica, pero no en la Región Metropolitana ni en otras regiones donde este agente no se encuentre presente.

El rol zoonótico de *E. canis* ha sido documentado en Venezuela con la identificación del agente por métodos moleculares en seis personas con síntomas compatibles con ehrlichiosis monocítica⁸. Con anterioridad el agente había sido identificado mediante cultivo en una persona asintomática en dicho país⁶ y su secuencia nucleotídica fue encontrada homóloga a la de aislados provenientes de perros y garrapatas⁷. Estos antecedentes y nuestros resultados deben alertar a los médicos clínicos ante la posible ocurrencia de casos humanos de ehrlichiosis monocítica en la ciudad de Arica.

En conclusión, se reporta por primera vez un agente transmisible por garrapatas con potencial zoonótico en la ciudad de Arica. Ello resalta la necesidad de implementar medidas efectivas de control de las garrapatas en el país, en particular en la zona norte, de modo de evitar o contener

Figura 1. Análisis filogenético. Árbol filogenético construido mediante el método de vecino más próximo (Neighbor-joining) utilizando la secuencia nucleotídica del gen 16S ARNr. Los valores de confianza (bootstrap) se indican en cada rama; Arica: cepa *Ehrlichia canis* encontrada en perro chileno. Los números de acceso a GenBank para las secuencias utilizadas en la construcción del árbol filogenético fueron las siguientes: AF373613.1 *Ehrlichia canis* isolate VDE, AF373612.1 *Ehrlichia canis* isolate VHE, M73221.1 *Ehrlichia canis* Oklahoma, M73226.1 *Ehrlichia canis* Florida U26740.1 *Ehrlichia canis* 611 (Israel), AF162860.1 *Ehrlichia canis* GZh982, U54805.1 *Ehrlichia canis* Germishuys, AF156786.1 *Ehrlichia canis* Gxht67, AF156785.1 *Ehrlichia canis* Gdt3, AY394465.1 *Ehrlichia canis* Madrid, AF536827.1 *Ehrlichia canis* Kagoshima, AY621071.1 *Ehrlichia canis* Turkey, EF011110.1 *Ehrlichia canis* Greece, EU106856.1 *Ehrlichia canis* strain TWN1, EU263991.1 *Ehrlichia canis* strain ECAN, DQ915970.1 *Ehrlichia canis* PDE, AF069758.1 *Cowdria ruminantium*, GU358691.1 *Ehrlichia muris*, AY135531.1 *Ehrlichia sp.* 'Rattus strain', AY077619.1 *Anaplasma platys*, AF172166.1 *Ehrlichia equi*, M73230.1 *Rochalimaea vinsonii*, M73229.1 *Rochalimaea henselae*, M73228.1 *Rochalimaea quintana*, M73227.1 *Ehrlichia ewingii*, AB196304.1 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, AY098730.1 *Ehrlichia sp.* Belluno, AF318946.1 *Ehrlichia ovina*, AF318944.1 *Anaplasma centrale*. Escala en el extremo inferior izquierdo indica 0,02 sustituciones por nucleótido.

la diseminación de este agente a otras zonas del país y la subsecuente aparición de casos en perros y en humanos. Es necesario realizar nuevos estudios que precisen la extensión geográfica de la presencia de *E. canis* en Chile.

Agradecimientos. A Carlos Tejeda, Clínica Veterinaria San Javier de Arica, por su apoyo al grupo de investigación.

Resumen

Se reporta un caso clínico de ehrlichiosis causada por *Ehrlichia canis* en un perro de la ciudad fronteriza de Arica, confirmado por técnicas moleculares. Un canino hembra de 10 años, mestizo siberiano, parasitado con ga-

rrapatas presentó un cuadro de hematomas, sangrado bucal profuso y marcado compromiso del estado general. En sus exámenes generales destacaba trombocitopenia (30.000 plaquetas/mm³); un test rápido inmunocromatográfico para *Ehrlichia canis* fue positivo. La amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 16S ARNr a partir de muestra de sangre mostró 100% de homología con *E. canis* de Perú. Se trata del primer reporte de la presencia de *E. canis* en Chile, agente de reconocido poder zoonótico.

Referencias bibliográficas

- 1.- Cohn L A. Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 863-84.
- 2.- de Castro M B, Machado R Z, de Aquino L P, Alessi A C, Costa M T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet Parasitol 2004; 119: 73-86.
- 3.- Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. Parasit Vectors 2008; 1: 25.
- 4.- Groves M G, Dennis G L, Amyx H L, Huxsoll DL. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Am J Vet Res 1975; 36: 937-40.
- 5.- González-Acuña D, Guglielmone A A. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of Chile. Exp Appl Acarol 2005; 35: 147-63. Review.
- 6.- Pérez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol 1996; 34: 2133-9.
- 7.- Unver A, Pérez M, Orellana N, Huang H, Rikihisa Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. J Clin Microbiol 2001; 39: 2788-93.
- 8.- Pérez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. Ann N Y Acad Sci 2006; 1078: 110-17.
- 9.- López J, Castillo A, Muñoz M, Hildebrand S. Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. Arch Med Vet 1999; 31: 211-4.
- 10.- Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A, et al. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1392-5.
- 11.- Abarca K, López J, González P, Dabanch J, Torres M, Solari V, et al. Evidencia seroepidemiológica de exposición humana a *Anaplasma* sp en Santiago. Rev Chilena Infectol 2008; 25: 359-62.
- 12.- López J, Rivera Mena, Concha J C, Gatica S, Loeffelholz M, Barriga O. Evidencia serológica de ehrlichiosis humana en Chile. Rev Med Chile 2003; 131: 67-70.
- 13.- Bélanger M, Sorenson H L, France M K, Bowie M V, Barbet A F, Breitschwerdt E B, et al. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. J Clin Microbiol 2002; 40 (9): 3506-8.
- 14.- Breitschwerdt E B, Hegarty B C, Hancock S I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2645-51.
- 15.- Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, et al. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. J Clin Microbiol 2007; 45: 2716-19.
- 16.- Anderson B E, Dawson J E, Jones D C, Wilson K H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 2838-42.
- 17.- Keysary A, Waner T, Rosner M, Warner C K, Dawson C E, Zass R, et al. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. Vet Parasitol 1996; 62: 331-40.
- 18.- Hua P, Yuhai M, Shide T, Yang S, Bohai W, Xiangrui C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. Microbiol Immunol 2000; 44: 737-9.
- 19.- Allsopp M, Visser E S, du Plessis J L, Vogel S W, Allsopp B A. Different organisms associated with heartwater as shown by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. Vet Parasitol 1997; 71: 283-300.
- 20.- Aguirre E, Sainz A, Dunner S, Amusatogui I, López L, Rodríguez-Franco F, et al. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. Vet Parasitol 2004; 125: 365-72.
- 21.- Unver A, Rikihisa Y, Kawahara M, Yamamoto S. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. Ann N Y Acad Sci 2003; 990: 692-8.
- 22.- Bekker C P, de Vos S, Taoufik A, Sparagano O A, Jongejan F. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. Vet Microbiol 2002; 89: 223-38.
- 23.- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. molecular biology and evolution 2011; 28: 2731-9.
- 24.- Lepe P. Prevalencia de ehrlichiosis canina en una población del sector sur de Santiago. Tesis para optar al título de Médico Veterinario, Universidad Santo Tomás, 2005.
- 25.- Gutjahr C. Caracterización de las alteraciones clínicas y hematológicas de la ehrlichiosis canina en la Región Metropolitana. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Universidad de Santo Tomás, 2005.
- 26.- Caballero C. Caracterización clínica y hematológica de la ehrlichiosis canina en Arica. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Católica de Temuco, 2010.