

COMUNICACIÓN CORTA

***Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en garrapatas
Rhipicephalus sanguineus sensu lato del linaje templado (Acari: Ixodidae),
provincia de Buenos Aires, Argentina**

Cicuttin GL^{1*}, De Salvo MN¹, Silva DA¹, Brito M², Nava S³

¹Laboratorio de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias Transmitidas por Vectores,
Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (CABA)

²Veterinaria "Nahuel" (Moreno, Buenos Aires)

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA),
Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (Rafaela, Santa Fe)

* Correspondencia: Gabriel Cicuttin, Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Av. Díaz Vélez 4821, C1405DCD, CABA (Argentina). E-mail: gcicuttin@gmail.com

Recibido: 14 Septiembre 2017. Aceptado: 25 Noviembre 2017. Disponible en línea: 28 Noviembre 2017
Editor: J. Venzal

RESUMEN. El objetivo del presente estudio es notificar el hallazgo de *Ehrlichia canis* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.) del linaje templado (LTe) colectadas sobre un canino con ehrlichiosis monocítica canina de José C. Paz (zona noroeste del Área Metropolitana de Buenos Aires –AMBA-). Se colectaron 32 garrapatas, siendo determinadas taxonómicamente como *R. sanguineus* s. l. (30 larvas y 2 ninfas). Mediante una PCR inicial para la familia Anaplasmataceae para un fragmento del gen ARNr 16S, resultaron positivas un grupo de 10 larvas y una ninfa. Dichas muestras positivas también fueron amplificadas mediante una PCR para un fragmento del gen *dsb* del género *Ehrlichia*, y posteriormente secuenciadas, resultando en un 100% de identidad con *E. canis*. Los especímenes de *R. sanguineus* s.l. positivos para *E. canis* fueron estudiados mediante una PCR para del gen mitocondrial 16S de garrapatas del grupo Metastrata, demostrándose su pertenencia al linaje templado de *R. sanguineus* s. l. Los estudios experimentales y los antecedentes epidemiológicos relacionan *E. canis* con *R. sanguineus* s. l. del linaje tropical, pero considerando que el único linaje de *R. sanguineus* detectado en AMBA ha sido el LTe, es necesario continuar investigando para dilucidar el mecanismo de transmisión y la dinámica vectorial en esta área.

SUMMARY. *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks of the temperate lineage (Acari Ixodidae), Buenos Aires Province, Argentina. The aim of the present study was to report the presence of *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.) ticks of the temperate lineage (LTe) collected on a dog with canine monocytic ehrlichiosis from José C. Paz (northwest area of the Buenos Aires Metropolitan Area - BAMA-). Thirty-two ticks were collected (30 larvae and 2 nymphs). A group of 10 larvae and one nymph were positive to *Ehrlichia* in the initial PCR targeting a fragment of the Anaplasmataceae family 16S rRNA gene. These positive samples were also amplified by PCR for a fragment of the *dsb* gene of the genus *Ehrlichia*, and then sequenced, resulting in a 100% identity with *E. canis*. Specimens of *R. sanguineus* s.l. positive for *E. canis* were determined as belonging to the temperate lineage of *R. sanguineus* s. l. through the analysis of sequences from the tick mitochondrial 16S rRNA gene. Experimental studies and epidemiological background have related *E. canis* infection with *R. sanguineus* s. l. ticks of the tropical lineage, but the results of this study put in evidence the needed of new epidemiological studies on the vectorial competence of the different lineages of *R. sanguineus* s.l. to transmit *E. canis*.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, Buenos Aires

Key words: *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, Buenos Aires

Introducción

Ehrlichia canis es el agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina (EMC), una enfermedad grave que puede cursar en forma subclínica, aguda o crónica, con fiebre, depresión, letargia, anorexia, pérdida de peso, desórdenes hematológicos y linfadenomegalia (Harrus et al., 2012). En América, esta enfermedad ha sido reportada en caninos desde EEUU hasta Argentina, incluyendo el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) (Harrus et al., 2012; Cicuttin et al., 2016).

El vector de *E. canis* a nivel mundial es la garrapata común del perro *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Cicuttin et al., 2016). En América, *R. sanguineus* s. l. está conformada por al menos dos linajes con distinta distribución biogeográfica y posiblemente distinta competencia vectorial (Moraes-Filho et al., 2015). 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; Nava et al., 2012). Hasta el momento, en nuestro país, *E. canis* fue detectada en especímenes de *R. sanguineus* s. l. LTr de Formosa (Cicuttin et al., 2015a), pero no en especímenes de *R. sanguineus* s. l. LTe de Salta, Corrientes, Chaco, Misiones y Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Cicuttin et al., 2015a; Cicuttin et al., 2015b; Oscherov et al., 2011).

El objetivo del presente estudio es notificar el hallazgo de *E. canis* en garrapatas *R. sanguineus* s. l. LTe colectadas sobre un canino con EMC de la localidad de José C. Paz (provincia de Buenos Aires).

Materiales y Métodos

En Abril de 2016 se recibieron garrapatas colectadas de un canino sin antecedentes de viaje procedente de José C. Paz (31°33'S, 58°45'O; zona noroeste del AMBA) con EMC confirmada por PCR en nuestro servicio.

Las garrapatas se conservaron en alcohol 70% hasta su identificación siguiendo las descripciones y claves taxonómicas presentadas en Walker et al. (2000) y Nava et al. (2017). La determinación taxonómica de las garrapatas fue complementada mediante el análisis de un fragmento de aproximadamente 420 pares de bases del gen mitocondrial 16S. El ADN se amplificó siguiendo los métodos y utilizando los cebadores presentados en Mangold et al. (1998).

El ADN fue extraído mediante el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las larvas se extrajeron en grupos de 10 especímenes, mientras que ninfas y adultos en forma individual.

Para la detección del género *Ehrlichia*, se realizó una PCR inicial para la familia Anaplasmataceae que amplifica un fragmento del 16S ARNr (Parola et al., 2001). Posteriormente el ADN se sometió a una segunda PCR que amplifica un fragmento del gen *dsb* del género *Ehrlichia* (Aguiar et al., 2007).

Los productos amplificados del gen mitocondrial 16S y del gen *dsb* fueron purificados con Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, EEUU) y secuenciados usando BigDye®

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de acuerdo al protocolo del fabricante en un secuenciador 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR (Hall, 1999) y se compararon entre sí y con aquellas depositadas en el GenBank usando el programa MEGA versión 5.0 (Tamura et al., 2011).

Resultados

En total se obtuvieron 32 garrapatas del canino examinado. Todas fueron determinadas taxonómicamente como *R. sanguineus* s. l. (30 larvas y 2 ninfas) y fueron procesadas para la extracción de ADN.

Un grupo de 10 larvas y una ninfa resultaron positivas para la PCR inicial del fragmento ARNr 16S de la familia Anaplasmataceae. Dichas muestras positivas fueron amplificadas también mediante la PCR para el fragmento del gen *dsb*. Complementariamente también se realizó la PCR del fragmento del gen *dsb* del ADN obtenido del perro con EMC, resultando positivo.

Los tres fragmentos amplificados del gen *dsb* fueron secuenciados (código de GenBank: MF805005), resultando en 100 % de similitud entre sí, así como con *E. canis* previamente hallada en perros de Ciudad Autónoma de Buenos Aires (código de GenBank: KU253450), *E. canis* cepa Uberlandia (código de GenBank: GU586135) y Sao Paulo (código de GenBank: DQ460715) halladas en Brasil, y *E. canis* cepa Jake (código de GenBank: CP000107) hallada en EEUU.

Las secuencias del gen 16S obtenidas del ADN de las muestras de los especímenes de *R. sanguineus* s.l. positivos para *E. canis* (código de GenBank: MF805004) demostraron que estas garrapatas pertenecen al linaje templado de *R. sanguineus* s.l., ya que las secuencias fueron idénticas al haplotipo II (código de GenBank: JX195168) perteneciente a *R. sanguineus* s.l. LTE (ver Nava et al., 2012).

Discusión

Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte de *E. canis* en *R. sanguineus* LTE. En América, los reportes previos de *E. canis* en garrapatas *R. sanguineus* s. l. han sido en regiones donde se distribuye el LTr (México, Venezuela, Brasil y norte de Argentina), mientras que hasta el momento no ha sido detectada en áreas donde se distribuye el LTE (sur de Brasil, Uruguay, Chile y resto de Argentina) (Cicuttin et al., 2015a). Por otra parte, un estudio experimental de transmisión de *E. canis* por ambos linajes de *R. sanguineus* s. l. mostró que el LTr es un vector competente de este patógeno pero no el LTE (Moraes-Filho et al., 2015).

La transmisión de *E. canis* en las garrapatas se da por vía transestadial pero no ocurre por vía transovárica, con lo cual, la bacteria es adquirida solamente al alimentarse sobre un hospedador infectado (Moraes-Filho et al., 2015). En nuestro estudio, la detección de *E. canis* fue realizada sobre *R. sanguineus* s. l. LTE colectadas sobre un canino con EMC, hecho que explica la positividad en las larvas halladas alimentándose sobre este hospedador. En este sentido, es importante resaltar que la utilización de técnicas moleculares ha incrementado el reporte de asociaciones entre garrapatas, hospedadores y patógenos. Sin embargo, esto también ha resultado en incorrectas interpretaciones sobre la capacidad vectorial de las garrapatas, especialmente considerando que garrapatas parcial o completamente ingurgitadas colectadas sobre hospedadores contenedrán microorganismos de los cuales pueden o no ser vectores y que pueden haber sido ingeridos con la sangre succionada (Estrada-Peña et al., 2013).

La circulación de *E. canis* en caninos de AMBA, notificada en 2013 (Eiras et al., 2013) y con un incremento en el número de casos año a año (Cicuttin et al., 2016), presenta el interrogante del mecanismo de transmisión de dicho patógeno en el área. El único linaje de *R. sanguineus* detectado en AMBA ha sido el LTE, pero, como se mencionó en párrafos anteriores, los estudios experimentales y los antecedentes epidemiológicos relacionan *E. canis* con *R. sanguineus* s. l. LTr pero no con LTE. La positividad de las garrapatas analizadas durante este estudio puede ser explicada por distintas hipótesis: I) las garrapatas se infectaron con *E. canis* tras alimentarse en perros que adquirieron la infección en otras áreas y la mantuvieron luego de su traslado de una ciudad a otra (la infección con *Ehrlichia*

puede ser persistente en el hospedador vertebrado), y esto no implica que *R. sanguineus* s. l. LTE sea el vector involucrado en estos casos; II) la existencia de focos locales de *R. sanguineus* s. l. LTr durante la época climática favorable que no llegan a establecerse como poblaciones estables; III) la posibilidad que *R. sanguineus* s. l. LTE presente una baja, pero no nula, capacidad vectorial para transmitir *E. canis*. En este sentido, esta última explicación, estaría conforme con la mayor prevalencia de EMC confirmada en caninos en áreas con *R. sanguineus* s. l. LTr con respecto al AMBA, así como la detección de *E. canis* en caninos clínicamente sanos en regiones con LTr, pero no en el AMBA (Cicuttin et al., 2016; Moraes-Filho et al., 2015; Eiras et al., 2013).

En conclusión, la EMC representa una enfermedad de gran importancia en medicina veterinaria y emergente en caninos del país. De todas formas, se debe considerar que la sola utilización de diagnóstico clínico o métodos serológicos rápidos cualitativos puede generar una sobreestimación de esta patología en la región. Por ello, es necesario realizar estudios utilizando técnicas moleculares confirmatorias para dilucidar el mecanismo de transmisión, la dinámica vectorial, así como establecer fehacientemente la prevalencia de esta patología en los caninos de áreas templadas de Argentina.

Bibliografía

- Aguiar DR, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LM, Labruna MBL. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. *J. Med. Entomol.* 44: 126–132.
- Chitimia Dobler L, Langguth J, Pfeffer M, Kattner S, Küpper T, Friese D et al. 2017. Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences. *Vet. Parasitol.* 239: 1–6.
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Gury Dohmen FE. 2016. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7: 954–957.
- Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. 2015a. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick-Borne Dis.* 6: 724–729.
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Siccardi FM, Gramajo L, Gury Dohmen FE. 2015b. Caninos domésticos con elevada infestación por garrapatas y patógenos bacterianos asociados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Revista Argentina de Zoonosis Y Enfermedades Infecciosas Emergentes* 10: 13–16.
- Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. 2013. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*

infections in dogs from Argentina. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* 36: 169–173.

Estrada Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM. 2013. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens--methodological principles and caveats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: 29.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* 41: 95-98.

Harrus S, Waner T, Neer TM. 2012. *Ehrlichia canis* infection (pp. 227-238). En: Greene C (ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. Ed. Elsevier, St. Louis.

Mangold A, Barges M, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84: 478-484.

Moraes Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. 2015. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Plos One* 10: e0139386.

Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielme AA. 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet. Parasitol.* 190: 547-555.

Nava S, Venzal JM, González Acuña D, Martins TF, Guglielme AA. 2017. *Ticks of the Southern Cone of America*. Ed. Academic Press, London. 375 pp.

Oscherov EB, Milano AMF, Lobo B, Anda P, Escudero R. 2011. Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70: 42-47.

Parola P, Inokuma H, Camicas JL, Brouqui P, Raoult D. 2001. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae and Ehrlichiae in African ticks. *Emerg. Inf. Dis.* 7: 1014-1017.

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. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Walker JB, Keirans JE, Horak IG. 2000. *The Genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World*. Ed. Cambridge University Press, Cambridge. 643 pp.
