

EVIDENCIA MOLECULAR DE ANAPLASMA PLATYS EN CANINOS DOMÉSTICOS DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES

CICUTTIN, G. L.¹; NAVARRO O'CONNOR, M.¹; LOBO, B.²; JADO, I.² & ANDA, P.²

RESUMEN

Las ehrlichiosis y anaplasmosis son importantes enfermedades emergentes que afectan humanos y animales. Con el objetivo de detectar patógenos transmitidos por garrapatas se estudiaron 15 caninos domésticos con un alto nivel de infestación, procedentes del barrio con necesidades básicas insatisfechas Villa N° 15 "Ciudad Oculta" de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina). Todos los animales estaban infestados con garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Para la detección de estos patógenos se utilizó una PCR múltiple combinada con hibridación en fase reversa. Se encontró un 33,3 % de los caninos positivos a *Anaplasma platys*, agente de anaplasmosis canina. Estudios adicionales en distintas poblaciones de caninos domésticos y en garrapatas podrían contribuir a la detección de cuadros clínicos en animales así como a la caracterización molecular de este microorganismo.

Palabras claves: *Anaplasma platys*, Ciudad de Buenos Aires, caninos.

SUMMARY

Molecular evidence of *Anaplasma platys* in dogs from Buenos Aires.

Ehrlichiosis and anaplasmosis are important emerging diseases that affect humans and animals. In order to detect pathogens transmitted by ticks we studied 15 domestic dogs from poor neighborhood Villa No. 15 "Ciudad Oculta", in Buenos Aires city (Argentina). All animals were highly infested with ticks from the *Rhipicephalus sanguineus* complex. For the detection of these pathogens, we used a multiplex PCR and subsequent reverse line blot hybridization. We found 33.3% of positive dogs for *Anaplasma platys*, agent of canine anaplasmosis. Additional studies in different populations of dogs and ticks may contribute to detect clinical cases in animals and molecular characterization of this organism.

Key words: *Anaplasma platys*, Buenos Aires city, dogs.

1.- Sección Serología y Pruebas Biológicas, Instituto de Zoonosis Luis Pasteur. Ministerio de Salud. GCABA. Email: gcicuttin@gmail.com

2.- Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III - Madrid, España.

Manuscrito recibido el 6 de febrero de 2012 y aceptado para su publicación el 3 de mayo de 2012.

INTRODUCCIÓN

Las ehrlichiosis y anaplasmosis son consideradas importantes enfermedades emergentes transmitidas por vectores que afectan tanto a humanos como a animales. Son producidas por bacterias Gram negativas, pleomórficas, intracelulares obligadas que infectan células de distintas líneas sanguíneas de una amplia variedad de mamíferos y principalmente transmitidas por garrapatas (Dagnone *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009). *Anaplasma platys* es la única que afecta a los trombocitos, tiene distribución mundial y se transmite por las garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* (Moraes Filho *et al.*, 2011; Nava *et al.*, 2009). *A. platys* es el agente causante de la anaplasmosis canina, también denominada trombocitopenia cíclica infecciosa canina, la cual resulta generalmente leve, cursando en ocasiones de forma subclínica, puede producir fiebre, anorexia, petequias, uveítis, adenopatía generalizada, leucopenia, anemia moderada, hipergammaglobulinemia moderada, hipoalbuminemia, hipocalcemia y especialmente trombocitopenia. La trombocitopenia ocurre en episodios de 3-4 días y a intervalos de 7-21 días, los valores mínimos de plaquetas se observan en el primer episodio, con el tiempo la trombocitopenia cíclica da paso a una trombocitopenia crónica de lenta recuperación. Estas variaciones en las manifestaciones clínicas hasta el momento no se han asociado con las distintas cepas existentes (Abarca *et al.*, 2007; De La Fuente *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009). El diagnóstico puede realizarse mediante la detección de las inclusiones citoplasmáticas compatibles por tinción de Giemsa en frotis sanguíneos (con baja sensibilidad y especificidad), por serología (la inmunofluorescencia indirecta es la técnica más utilizada, aunque puede presentar reacciones cruzadas

con otras ehrlichias y anaplasmas) y mediante técnicas de amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos (PCR) (De La Fuente *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009). En cuanto al vector, estudios realizados sobre el complejo *Rh. sanguineus*, indican que existen diferentes especies en América, siendo probablemente en Argentina y Uruguay introducidas desde Europa, mientras que en Brasil, Paraguay, Perú y Centroamérica procedentes desde África (Moraes Filho *et al.*, 2011; Nava *et al.*, 2009).

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de patógenos transmitidos por garrapatas en un grupo de caninos domésticos con alto nivel de infestación por garrapatas, provenientes de un barrio con necesidades básicas insatisfechas de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

MATERIALES Y MÉTODOS

En el mes de Diciembre de 2004 se recolectaron 15 muestras de sangre entera de caninos domésticos de Villa N° 15 "Ciudad Oculta" de la CABA (34°40'8.25"S / 58°29'29.46"O). Se seleccionaron animales con una alta infestación por garrapatas (más de 15 ejemplares adultos prendidos). Las muestras sanguíneas se extrajeron por punción de vena cefálica o yugular bajo el consentimiento de los propietarios de los caninos. Se utilizó como anticoagulante citrato de sodio al 3,2 % y se conservaron a -70°C hasta su procesamiento. De cada animal también se recolectaron garrapatas en forma manual para su identificación taxonómica siguiendo las claves descriptas (Boero, 1957). A su vez, se registraron las siguientes variables: sexo, raza, edad y hábitos (domiciliario: el animal sale fuera del hogar en forma con-

trolada / peridomiciliario: sale sin control / vagabundo: sin dueño determinado).

La extracción de ADN a partir de la sangre entera se realizó mediante el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Se realizaron 3 PCR's múltiples: para *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp./*Neorickettsia* spp. y *Coxiella burnetii* (16S rRNA y *hipAB-IS1111*-respectivamente); *Bartonella* spp. y *Francisella* spp. (16S rRNA y *lpaA*); y *Borrelia* spp. y *Rickettsia* spp. (16S rRNA y 23S-5S rRNA). Y una cuarta PCR simple para la detección de *A. phagocytophilum* (*mSP2*). (Anda *et al.*, 2006, 2011; Bandarika *et al.*, 2007; Escudero *et al.*, 2008; García *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 2009). Las PCR's combinadas con las sondas específicas para la hibridación en fase reversa (RLB de sus siglas en inglés: reverse line blot), son capaces de detectar *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. platys*, *Bartonella* sp., *Borrelia* sp., *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *E. ovina*, *E. muris*, *E. ruminatum*, *Francisella* sp., *Neorickettsia sennetsu*, *N. risticii* y *Rickettsia* sp. (grupo de las fiebres manchadas y grupo de las fiebres tíficas) (Cuadro 1).

La positividad para cada especie bacteriana se analizó de acuerdo a las variables por medio de pruebas χ^2 o test de Fisher utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 15.0, SPSS Ibérica, Madrid, España). El nivel de significación fue fijado en $p < 0,05$.

RESULTADOS

El 66,7% de los caninos muestreados eran machos, en su mayoría de raza indefinida (93,3%), de entre 1 y 7 años (66,7%) y con hábitos peridomiciliarios (86,7%). Se recolectaron 377 garrapatas de estos animales, todas identificadas como pertenecientes al complejo *Rh. sanguineus* (260 adultos y 117 ninfas).

El 33,3% de las muestras de sangre analizadas mediante PCR/RLB resultaron positivas a *A. platys* (figura 1). De estos positivos, el 60% fueron machos, el 60% tenían menos de 1 año de vida y todos eran de raza indefinida y con hábitos peridomiciliarios. Para el resto de los patógenos evaluados todas las muestras resultaron negativas.

DISCUSIÓN

Diversos métodos diagnósticos por PCR son utilizados para el diagnóstico de estos patógenos en sangre de caninos domésticos, la ventaja de la combinación con RLB es que permite la detección e identificación de numerosos patógenos al mismo tiempo (Sparaganol *et al.*, 2003). En nuestro estudio, *A. platys* fue la única especie detectada en la sangre de estos animales.

Los niveles de positividad para *A. platys* en caninos varían desde aproximadamente un 19% en el Caribe, 16% en Venezuela y Brasil (aunque con desigual distribución según la región del país), 20% en Chile hasta un 6-9% en España y 4% en Italia (Abarca *et al.*, 2007; Dagnone *et al.*, 2009; De La Fuente *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2006). Estas variaciones están relacionadas con la población canina estudiada (cantidad de muestras y tipo de población canina estudiada), los niveles de infestación por garrapatas y el método diagnóstico utilizado (Santos *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2006). Según nuestro conocimiento, esta es la primera detección molecular de *A. platys* en caninos domésticos de Argentina. El alto porcentaje de infección encontrado en nuestro estudio probablemente se deba a la población canina analizada, compuesta por

individuos procedentes de barrios con bajos recursos y con un elevado nivel de infestación por el vector *Rh. sanguineus*, sumado a la alta sensibilidad de la metodología diagnóstica. Dado el pequeño número de muestras analizadas no se puede inferir diferencias en la infección debidas a las variables estudiadas (edad, sexo, raza y hábitos). En Argentina, *A. platys* ha sido hallada en garrapatas del complejo *Rh. sanguineus* recolectadas en caninos domésticos de un área urbana de Corrientes, con una metodología

molecular similar a la realizada en nuestro estudio (Oscherov *et al.*, 2011).

En cuanto al rol zoonótico de *A. platys*, los datos de estudios actuales disponibles no son concluyentes (Abarca *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2009). En Venezuela, se han encontrado inclusiones citoplasmáticas de estos patógenos en plaquetas de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, pero no se ha identificado de forma fehaciente el agente implicado (Tami & Tami, 2004). Por otra parte, en Argentina,

Cuadro 1: Secuencias de oligonucleótidos y sondas utilizadas en este estudio.

Organismo	Nombre	Diana	Secuencia (5'-3')	Referencia
Oligonucleótidos				
<i>A. phagocytophilum</i>	MSP3F	<i>msp2</i>	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	Toledo <i>et al.</i> , 2009
	MSP3R	<i>msp2</i>	b-GCCCGAGTAACARCATCATAAGC	Toledo <i>et al.</i> , 2009
<i>Ehrlichia Anaplasma</i>	16S/REPmod	16S rRNA	CRGAACGAAAGGCTTCGCGYARIG	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>Norcineta</i> spp.	16S/AE-Rmod	16S rRNA	b-GCRRITACKCACCCCTCTGCCAC	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>Bartonella</i> spp.	P24E-mod	16S rRNA	CTTCCAGTTMGCGCTGGATC	García <i>et al.</i> , 2008
	16S-R	16S rRNA	b-GCCYCCCTTGGCGTITAGCACAGCA	García <i>et al.</i> , 2008
<i>Borrelia</i> spp.	BOH ¹	16S rRNA	CCGTGCCAGTGGGCTCTTAA	Gil <i>et al.</i> , 2005
	16S3B	16S rRNA	b-GCCGGCTGCTGCCACGTAATATAGC	Gil <i>et al.</i> , 2005
<i>Coxiella burnetii</i>	Trans 1	<i>hpaAB</i>	TATGTATCCACCCTAGCCAGTC	Bandarika <i>et al.</i> , 2007
	Trans 2	<i>hpaAB</i>	b-CCCAACAACACCTCTTATTTC	Bandarika <i>et al.</i> , 2007
<i>Francisella</i> spp.	FT593	<i>lpxA</i>	b-GYAGGTTTAGCKAGCTGTCTAC	Escudero <i>et al.</i> , 2008
	FT825	<i>lpxA</i>	b-GGAGCYTGCCATTGTAATCTTAC	Escudero <i>et al.</i> , 2008
<i>Rickettsia</i> spp.	RCK/23-5-F	23S-5S rRNA	GATAGCTCRGRTGTGGAAGCAC	Jado <i>et al.</i> , 2006
	RCK/23-5-R	23S-5S rRNA	b-TCGGGAYGGGATCGTGTGTTC	Jado <i>et al.</i> , 2006
Sondas				
<i>Anaplasma</i> spp.	S-MSP2	<i>msp2</i>	a-GGT TACGAGGCGCTTCAAGACC	Toledo <i>et al.</i> , 2009
<i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. bovis</i> , <i>A. equi</i>	S-PHA	16S rRNA	a-GGMITATTCITTTATAGCTGTCT	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>E. chaffeensis</i>	S-CHA	16S rRNA	a-ATTGCTTATAACCCTTTGGTGT	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> , <i>A. ovis</i>	S-MCO	16S rRNA	a-CAGCTTGCTGCGTGATAGG	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>E. ewingii</i>	S-EWI	16S rRNA	a-GAACAATTCCTAATAATAGCTC	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>E. canis</i> , <i>E. ovina</i>	S-CANOVIN	16S rRNA	a-GGACAAATATTTATAGCCCTGGC	Anda <i>et al.</i> , 2011
<i>E. muris</i>	S-MUR	16S rRNA	a-CGAACGGATAGCTACCCATAGC	Anda <i>et al.</i> , 2011
<i>A. platys</i>	S-PLA	16S rRNA	a-GATTTTTGTGCTAGCTTGCTATG	Anda <i>et al.</i> , 2006
<i>N. estrosi</i>	S-RIS	16S rRNA	a-GGAATCAGGCTGCTTGCAAG	Anda <i>et al.</i> , 2011
<i>N. estrosi/N. senetsu</i>	S-SEN/RIST	16S rRNA	a-GGAATCAAAGCTGCTTTC	Anda <i>et al.</i> , 2011
<i>E. nummularum</i>	S-PLM	16S rRNA	a-GCAGATTTATATACGTYGGCC	Anda <i>et al.</i> , 2011
<i>Bartonella</i> spp.	S-BART 16S	16S rRNA	a-CTCGCCCTTAGTGGCAGCATT	García <i>et al.</i> , 2008
<i>Borrelia</i> spp.	P-16S-BOR	16S rRNA	a-GAGGAAATAAGCTTTGTAGGAATGACA	Gil <i>et al.</i> , 2005
<i>Coxiella burnetii</i>	C. burnetii	<i>hpaAB</i>	a-GCAAGAATAACGACTCAGCA	Bandarika <i>et al.</i> , 2007
<i>F. tularensis tularensis</i> , <i>F. tularensis holarctica</i> , <i>F. tularensis novicida</i>	P-TUL	<i>lpxA</i>	a-AGATACTGCTGCTGCTCAGACAG	Escudero <i>et al.</i> , 2008
Endosimbiontes tipo- <i>Francisella</i>	P-ENDO2	<i>lpxA</i>	a-CAGCTACATCAACRGGCCGTAG	Escudero <i>et al.</i> , 2008
<i>Rickettsia</i> spp.	GP-RICK	23S-5S rRNA	a-TAGCTCGAATTGRTTTACTTTTG	Jado <i>et al.</i> , 2006
<i>Rickettsia</i> Grupo Fiebres Manchadas	GP-SFG	23S-5S rRNA	a-ACTCACAAAGTTATCAGT	Jado <i>et al.</i> , 2006
<i>Rickettsia</i> Grupo Tifóide	GP-TG	23S-5S rRNA	a-GTTATCTATCGTTTTTATGTYACG	Jado <i>et al.</i> , 2006

b- *Borrelia*; a- grupo *Anaplasma*

C+	x	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	C-	C+	C+	C+	
●																			●	●	●	S-MSP2
																						S-PHA
																						S-CHA
●																			●	●	●	S-MCO
●																			●	●	●	S-EWI
●																			●	●	●	S-CANOVIN
●																			●	●	●	S-MUR
●										●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	S-PLA
●																			●	●	●	S-SEN-RIST
●																			●	●	●	S-RUM

Fig. 1: Resultados del RLB. Detalle de los resultados de las sondas específicas de la familia Anaplasmataceae. En las filas: sondas específicas para *Anaplasma* spp. (S-MSP2); *A. phagocytophilum*, *A. bovis* y *A. equi* (S-PHA); *E. chaffeensis* (S-CHA); *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* (S-MCO); *E. ewingii* (S-EWI); *E. canis* y *E. ovina* (S-CANOVIN); *E. muris* (S-MUR); *A. platys* (S-PLA); *N. sennetsu* y *N. risticii* (S-SEN/RIST); *E. ruminatum* (S-RUM). En las columnas: C+ (a la izquierda de la figura): control positivo RLB; C-: control negativo de PCR; C+ (a la derecha): controles positivos de PCR; calles 9, 11, 13, 14 y 16: muestras positivas a *Anaplasma platys*.

Ehrlichia chaffeensis, agente de la ehrlichiosis monocítica humana, ha sido hallada en estudios serológicos humanos y en garrapatas *Amblyomma parvum* (Tomassone *et al.*, 2008), destacándose la importancia de los patógenos de la familia Anaplasmataceae como agentes zoonóticos en nuestro país.

En un futuro se deberían ampliar los estudios sobre *A. platys* en distintas poblaciones de caninos domésticos así como en garrapatas del complejo *Rh. sanguineus*, evaluando los niveles de prevalencia y detectando cuadros clínicos, lo que posiblemente conduciría a una mejor caracterización molecular de este organismo en Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- ABARCA, K.; J. LÓPEZ; C. PERRET; J. GUERRERO; P. GODOY; A. VELOZ; F. VALIENTE ECHEVERRÍA; U. LEÓN; C. GUTJAHR; T. AZÓCAR. 2007. *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (9): 1392-1395.
- ANDA, P.; R. ESCUDERO; I. RODRÍGUEZ; I. JADO; M. JIMÉNEZ. 2006. Method and kit for the detection of bacterial species by means of DNA. U.S. patent WO/2006/136639.
- ANDA, P.; H. GIL; R. ESCUDERO; I. JADO; I. RODRÍGUEZ. 2011. Method the detection of bacterial species of the genera *Anaplasma/Ehrlichia* and *Bartonella*. U.S. patent US007989170B2.
- BARANDIKA, J.F.; A. HURTADO; C. GARCÍA; H. GIL; R. ESCUDERO; M. BARRAL; I. JADO; RA. JUSTE; P. ANDA; A.L. GARCÍA PÉREZ. 2007. Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Wild and Domestic Small Mammals in Northern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(19): 6166-6171.
- BOERO, J. J. 1957. Las garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea). Buenos