

EVALUACIÓN DEL DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE EHRlichiosis CANINA EN LA CIUDAD DE CALI, COLOMBIA

Viviana Giraldo-Ospina

Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Naturales, Universidad
ICESI. Cali, Colombia

Sebastián Giraldo-Ocampo

Postgrado en Ciencias Biomédicas, Escuela
de Ciencias Básicas, Universidad del Valle.
Cali, Colombia

Andres Castillo

Postgrado en Ciencias Biomédicas, Escuela
de Ciencias Básicas, Universidad del Valle
Laboratorio TAOLab/CiBioFi, Departamento
de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y
Exactas, Universidad del Valle
Cali, Colombia

All content in this magazine is
licensed under a Creative Com-
mons Attribution License. Attri-
bution-Non-Commercial-Non-
Derivatives 4.0 International (CC
BY-NC-ND 4.0).



Resumen: La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis canina en un centro veterinario de la ciudad de Cali-Colombia, mediante la confirmación por PCR del diagnóstico. Se extrajo el ADN de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA de 20 perros domésticos con diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis y se amplificaron los genes 16s rRNA de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. y 18S rRNA de *Babesia* spp., encontrando que el 10/20 (50%) de los perros fueron negativos para los microorganismos evaluados, y uno fue positivo para *Babesia* spp. La secuenciación del gen 16S de cuatro de las muestras positivas, reveló que, en dos de las muestras, el microorganismo era *Anaplasma phagocytophilum*. En conclusión, en el centro veterinario evaluado, hay un sobrediagnóstico de ehrlichiosis, además de un diagnóstico errado en algunos casos, lo cual es posible que ocurra a lo largo de toda la ciudad por variables fuera del control del veterinario o del centro veterinario.

Palabras claves: Ehrlichiosis, diagnóstico presuntivo, Cali, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp.

INTRODUCCIÓN

La familia Anaplasmataceae es una familia de bacterias intracelulares en su mayoría de importancia para la salud tanto de humanos como para algunos animales, principalmente perros y bovinos¹. Esta familia está compuesta por cuatro géneros: *Ehrlichia*, causante de Ehrlichiosis; *Anaplasma*, causante de anaplasmosis; *Neorickettsia*, causante de ehrlichiosis sennetsu; y *Wolbachia*, bacterias por lo general no patógenas. Varias especies dentro de esta familia han sido identificadas como agentes etiológicos de enfermedades zoonóticas con alto riesgo para la salud humana, de las cuales destacan *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma*

phagocytophilum y *Neorickettsia sennetsu*¹.

La ehrlichiosis es una enfermedad que afecta perros, humanos y venados; al igual que la mayoría de los miembros de la familia Anaplasmataceae, es transmitida por garrapatas y presenta una fase subclínica, aguda y crónica. En la fase aguda, los síntomas más frecuentes son: fiebre, letargia, vomito, diarrea, linfadenopatía, esplenomegalia, edemas, desordenes de sangrado y secreciones mucopurulentas oculares. En algunos casos, donde la infección se vuelve crónica, incluso se pueden presentar problemas más graves como pancitopenias y anemia².

Para el diagnóstico de la ehrlichiosis canina se emplean cuatro estrategias: un análisis hematológico donde se estudian los cambios hemáticos que ocurren durante la presencia del patógeno; la identificación por examinación directa de frotis sanguíneo donde se reconocen formas de racimos o mórulas dentro de las células infectadas; diagnóstico serológico que incluye inmunofluorescencia indirecta (IFI) y prueba ELISA; y la detección molecular, por medio de PCR, usando el gen 16S ribosomal³. De estas pruebas, el análisis hematológico y la examinación por frotis son las pruebas rutinarias para el diagnóstico de ehrlichiosis; sin embargo, estas pruebas rutinarias se pueden considerar como inespecíficas. Sumado a esto, existe una similitud sintomatológica con otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la anaplasmosis y babesiosis, cuyos síntomas son los mismos durante los primeros estadios de la enfermedad^{1,4}. Esta similitud de síntomas entre enfermedades causadas por diferentes microorganismos, hace más difícil la identificación del agente causal de la ehrlichiosis por pruebas rutinarias sin las debidas ayudas diagnósticas de laboratorio. Frente a esta problemática, se debe buscar la confirmación del diagnóstico y, dada la posibilidad de reactividad cruzada entre

especies del mismo género en las pruebas serológicas, preferencialmente por biología molecular, con el fin de guiar la selección del tratamiento correcto, así como un control y vigilancia de la enfermedad más precisa, especialmente para descartar casos de infecciones por los agentes con un alto potencial zoonótico como *Ehrlichia chaffeensis* y *Anaplasma phagocytophilum*⁵.

En Colombia, la ehrlichiosis canina hace parte de las enfermedades más comunes en perros domésticos, y dada la similitud de síntomas y el diagnóstico con base en pruebas rutinarias como se mencionó anteriormente, es importante evaluar el correcto diagnóstico de esta enfermedad. En el presente estudio se abordó de manera exploratoria este problema, mediante la confirmación molecular del diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis canina en perros mascotas, amplificando y secuenciando el gen 16S ribosomal para identificación de *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* y *Neorickettsia spp.* y 18S para el protista *Babesia spp.*, para descartar babeiosis, otra enfermedad común en caninos domésticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre de perros mascotas entre mayo-septiembre 2018 que asistieron a una clínica veterinaria de la ciudad de Cali y que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: 1) diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis dado por el médico veterinario tratante, 2) disponibilidad de muestra rutinaria de sangre del día del diagnóstico, tomada para frotis sanguíneo y hemograma y 3) el responsable de la mascota haya autorizado explícitamente el uso de la muestra de sangre para este estudio después de explicársele los objetivos y alcances del mismo. En el periodo del estudio, fueron ingresados 193 perros mascotas, de los cuales, 27 fueron

diagnosticados de manera presuntiva con ehrlichiosis, obteniendo consentimiento para el estudio de los responsables de 20 perros. El diagnóstico presuntivo se hizo con base en los siguientes síntomas: fiebre, diarrea, inapetencia, vómito, encías pálidas, secreciones nasales, deshidratación y pupilas grisáceas.

De las muestras de sangre, tomadas de forma rutinaria para el diagnóstico presuntivo de la enfermedad, se tomaron cinco gotas de sangre las cuales se almacenaron en tarjetas FTA Whatman™. A partir de estas tarjetas se extrajo el ADN mediante los métodos de Chelex-100 y Salting Out, se evaluó la pureza del material genético mediante Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific) y su integridad y presencia de inhibidores de la PCR mediante la amplificación de un fragmento de 118 pb del gen constitutivo β -globina canina usando los cebadores PCO3_F/ PCO4_R y las condiciones descritas previamente⁵. Después de evaluar las condiciones del ADN extraído, se realizó la detección de *Ehrlichia spp* mediante PCR convencional, con los cebadores EcaA17F/ Eca817R y Eca750F/ EcaEC3R, los cuales amplifican fragmentos de 866 y 691 pb respectivamente, usando las condiciones descritas previamente⁶. Se tomaron como controles positivos, tres muestras positivas para *Ehrlichia canis* mediante la prueba Antigen Rapid *E. canis* Ab Test Kit (Bionote). La detección de *Babesia spp.* se realizó usando los cebadores Bab3.1_R/ Bab5.1v2_F que amplifican un fragmento de 600 pb, usando las condiciones descritas previamente⁷.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección de *Ehrlichia spp* por la técnica molecular de la PCR fue positiva en 10/20 (50%) muestras de sangre de los perros domésticos y de *Babesia spp.* en 1/20 (5%). Este resultado sugiere que hay

una sobreestimación en el diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis canina, además de un diagnóstico incorrecto para uno de los perros analizados en el estudio, evidenciando la importancia de la confirmación del diagnóstico mediante técnicas moleculares o serológicas.

De estas 10 muestras positivas para *Ehrlichia* spp, se realizó la secuenciación mediante el método dideoxi (Sanger) usando uno de los fragmentos amplificados del gen 16S, para una confirmación adicional del agente causante de la enfermedad de los perros y reconstruir una filogenia de estos microorganismos. Las secuencias obtenidas se agruparon con ClustalX en el programa MEGA7. Se utilizó el método de máxima verosimilitud con el modelo de evolución de nucleótidos K2+G (Gamma), con un bootstrap de 100 repeticiones (figura 1). Dos de las muestras, nombradas V10 y V14, se agruparon con la especie *Ehrlichia canis* con un soporte de nodo de 93%. Las otras dos muestras, nombradas V8 y V19, se agruparon con la especie *Anaplasma phagocytophilum* con un soporte de nodo de 89%.

La presencia de la bacterias *E. canis* era esperado, sin embargo, la identificación de la bacteria *A. phagocytophilum* sugiere que no solo hay una sobrediagnóstico presuntivo de ehrlichiosis canina, sino que, algunos de estos casos en donde los síntomas son causados por bacterias de la familia Anaplasmatataceae, pueden tratarse de otras bacterias diferentes a *Ehrlichia* spp., y por lo tanto ser una enfermedad diferente; en estos dos casos particulares, se confirmó que la infección en estos perros no era ehrlichiosis sino anaplasmosis. Mas aún, a diferencia de *E. canis*, *A. phagocytophilum* es un reconocido patógeno con un alto potencial zoonótico, generando preocupaciones del subdiagnóstico de esta bacteria patógena y las implicaciones en la vigilancia y el control

de la enfermedad anaplasmosis granulocítica humana, causa por esta bacteria¹.

En Colombia, una alta diversidad en la familia Anaplasmatataceae ha sido reportado⁸, lo cual sugiere que características climatológicas de predominio tropical reúne todas las condiciones que favorecen la diseminación de vectores transmisores de estos patógenos. Igualmente, el diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis por sí mismo presenta un reto para los médicos veterinarios ya que a pesar de considerarse un progreso en el establecimiento de cuadros clínicos de patologías e índices hematológicos para el diagnóstico presuntivo de esta enfermedad, este tiende a ser todavía subjetivo ya que la sintomatología asociada a ehrlichiosis varía significativamente a lo largo de cada una de las tres fases descritas (aguda, subclínica y crónica), donde factores involucrados con la naturaleza del animal y los patógenos como la virulencia de las cepas, diferencias entre razas, compromiso del sistema inmune y enfermedades concomitantes^{1,9} dificulta el diagnóstico presuntivo, promoviendo que en muchos casos se presente un diagnóstico tardío o incluso erróneo de la enfermedad que podría implicar serios problemas para la salud del animal así como para los esfuerzos de vigilancia y control de las enfermedades zoonóticas causadas por algunas de estas bacterias.

Por todo lo anterior y los resultados encontrados en este estudio exploratorio, se genera la necesidad de un estudio a mayor escala que evalúe si efectivamente esta enfermedad presenta un sobrediagnóstico en la ciudad de Cali y otras ciudades del país, escenario altamente probable por las razones anteriormente descritas. También es necesario evaluar la prevalencia de bacterias con potencial zoonótico y que causan síntomas similares a la enfermedad causada por *E. canis*, como *A. phagocytophilum* y

E. chaffeensis, ya que en Colombia se ha reportado la enfermedad causada por esta última bacteria en humanos¹⁰. Idealmente, la confirmación del diagnóstico presuntivo de ehrlichiosis debería ser por métodos moleculares y/o serológicos, sin embargo, estos presentan un alto precio en comparación con las pruebas rutinarias, razón por la cual los responsables de mascotas optan por aceptar el diagnóstico presuntivo de la enfermedad y el médico veterinario no puede hacer la confirmación de la ehrlichiosis. Esto nuevamente evidencia la necesidad de establecer las prevalencias de estas bacterias en la ciudad, así como un número estimado de casos activos, para ayudar a guiar el posible diagnóstico de la enfermedad, así como para fortalecer la vigilancia y control epidemiológico de estas enfermedades, tanto en caninos como en humanos.

CONCLUSIONES

En conclusión, en este estudio piloto exploratorio se encontró que en una clínica veterinaria de la ciudad de Cali se presenta un sobrediagnóstico presuntivo de ehrlichiosis dado por los costos de las técnicas confirmatorias y la similaridad de síntomas con otras enfermedades; además de que, en dos de los casos analizados, la enfermedad era anaplasmosis y no ehrlichiosis. Esta última genera una importante preocupación debido a que *A. phagocytophilum* tiene un alto potencial zoonótico y hace necesarios estudios en una mayor escala para establecer la frecuencia de bacterias patógenas de la familia Anaplasmataceae en perros en la ciudad.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés con la clínica veterinaria en la que se realizó el estudio, así como tampoco con ninguna entidad pública o privada.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

La presente investigación no ha recibido ninguna beca específica de agencias de los sectores público, comercial, o sin ánimo de lucro.

REFERENCIAS

1. Rikihisa, Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: Subversive manipulators of host cells. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, p.328–339, 2010.
2. Mylonakis, M.E.; Siarkou, V.I.; Koutinas, A.F. Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An update on the pathogenesis, diagnosis, and management. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. v.65, p.129–134, 2010.
3. Rojas, A.; Rueda, A.; Díaz, D. et al. Identificación de *Ehrlichia canis* mediante PCR anidada. **Veterinaria y Zootecnia**. v.7, p.37–48, 2013.
4. Solano-Gallego, L.; Sainz, Á.; Roura, X. et al. A review of canine babesiosis: The European perspective. **Parasites and Vectors**. v.9, p.1–18, 2016.
5. Sainz, Á.; Roura, X.; Miró, G. et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites and Vectors**. v.8, p.1–20, 2015.
6. Unver, A.; Perez, M.; Orellana, N. et al. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.2788–2793, 2001.
7. Yabsley, M.J.; Work, T.M.; Rameyer, R.A. et al. Molecular phylogeny of *Babesia poeala* from brown boobies (*Sula leucogaster*) from Johnston Atoll, central Pacific. **The Journal of parasitology**. v.92, n.2, p.423–425, 2016.
8. Cartagena-Yarce, L.; Ríos-Osorio, L.; Cardona-Arias, J. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Dogs with Suspected Infection by Tick-Borne Pathogens in Medellín, 2012-2014. **Revista de Medicina Veterinaria**. p.51–62, 2015.
9. Nandi, B.; Chatterjee, M.; Hogle, K. et al. Antigen display, T-cell activation, and immune evasion during acute and chronic ehrlichiosis. **Infection and Immunity**. v.77, p.4643–4653, 2009.
10. Hidrón-Botero, A.; Muñoz-Ramírez, E.; Vega-Miranda, J. First case of human monocytic ehrlichiosis reported in Colombia. **Infectio**. v.18, p.162–166, 2014.

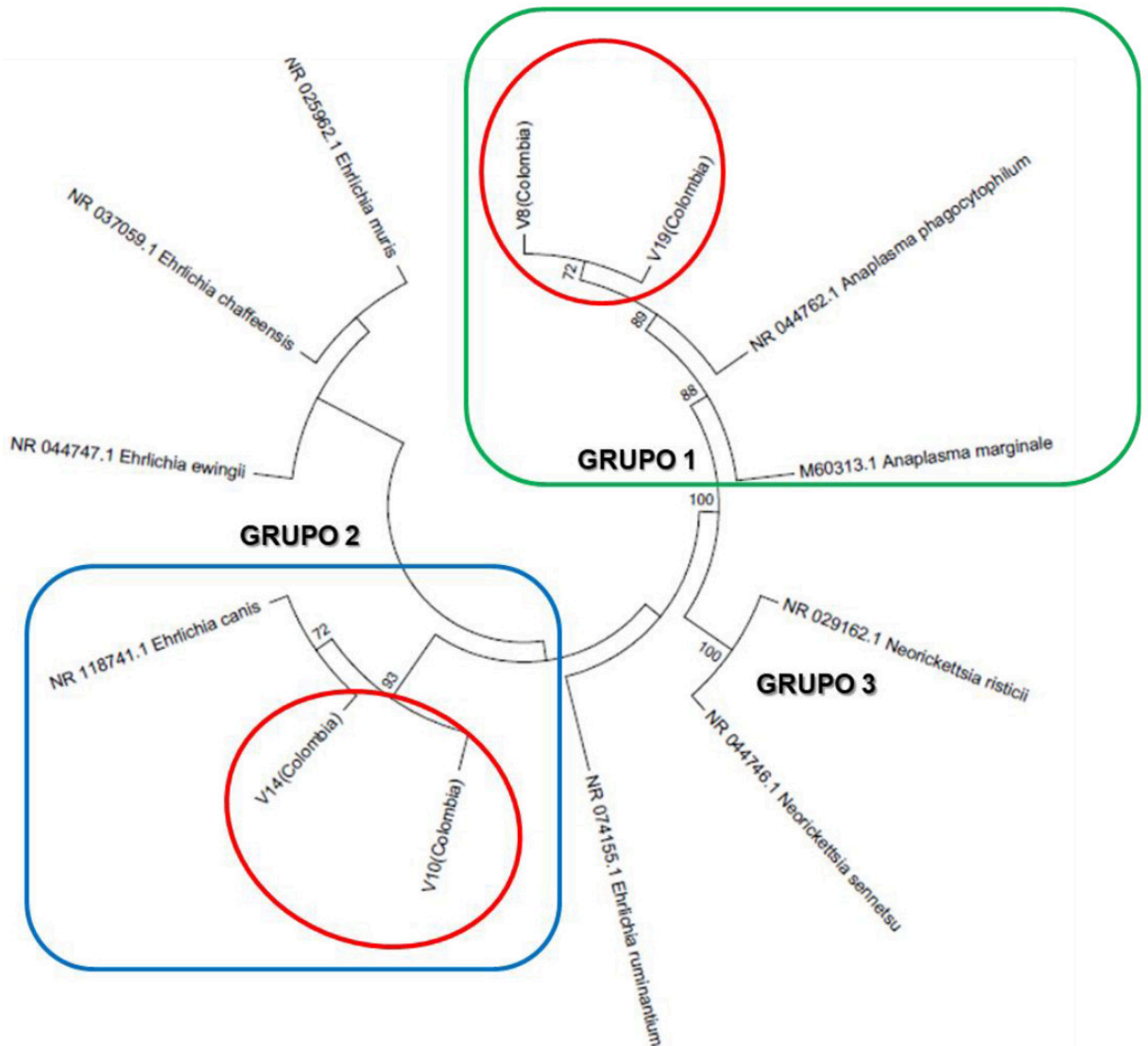


Figura 1. Relación de las bacterias identificadas en una clínica veterinaria de la ciudad de Cali, con miembros de la familia Anaplasmataceae. Las secuencias de las bacterias identificadas se agruparon con *E. canis* (muestras V10 y V14) y *A. phagocytophilum* (muestras V8 y V19). El color rojo indica las secuencias obtenidas en el estudio, el color verde representa las agrupaciones con *A. phagocytophilum* y el color azul representa las agrupaciones con *E. canis*. Los caracteres alfanuméricos antes del nombre de las bacterias representan el código de identificación del Genbank de cada una.