

# Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica

## (Ehrlichiosis and anaplasmosis in Costa Rica)

Gaby Dolz,<sup>1,2</sup> Leyda Ábrego,<sup>2</sup> Luis E. Romero,<sup>2</sup> Liliana Campos-Calderón,<sup>3</sup> Laura Bouza-Mora,<sup>3</sup> Ana E. Jiménez-Rocha<sup>4</sup>

### Resumen

La ehrlichiosis y la anaplasmosis son enfermedades infecciosas producidas por bacterias de la familia *Anaplasmataceae* y transmitidas por garrapatas. Ambas afectan, entre otras especies, al hombre, ocasionando sintomatología que puede ser asociada a un resfriado común o con signos clínicos compatibles con el dengue hemorrágico, patología que se presenta frecuentemente en Costa Rica. Tanto la ehrlichiosis como la anaplasmosis son consideradas también enfermedades de importancia en Medicina Veterinaria. A continuación se brinda una revisión sobre los hallazgos obtenidos en investigaciones realizadas en el país para determinar la presencia y distribución de *Ehrlichia* y *Anaplasma* en Costa Rica. *Ehrlichia canis* se encuentra ampliamente distribuida en el país y es la especie predominante en perros y garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*). Adicionalmente, se ha detectado, aunque en menor porcentaje, la presencia de *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum* en perros y sus garrapatas. También se ha determinado la presencia de *A. phagocytophilum* en un venado cola blanca, y de *E. canis* en humanos donadores de bancos de sangre mediante técnica serológica y molecular.

**Descriptores:** *Ehrlichia*, *Anaplasma*, humanos, perros, venados cola blanca, garrapatas

### Abstract

Ehrlichiosis and anaplasmosis are tick borne infectious diseases caused by bacteria from the family Anaplasmataceae. They both can infect humans, amongst other species, and their clinical presentation can be associated to a common cold or compatible to dengue hemorrhagic fever, a common disease in Costa Rica. Ehrlichiosis and anaplasmosis are also considered diseases with veterinary importance. Following is a review of the findings from research conducted in the country to determine the presence and distribution of *Ehrlichia* and *Anaplasma* in Costa Rica. *Ehrlichia canis* is widely distributed in the country, prevailing in dogs and their ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Also, the presence of *Anaplasma platys* and *Anaplasma phagocytophilum* has been detected in dogs and their ticks, although less frequently. We also detected the presence of *A. phagocytophilum* in white-tailed deer, and *E. canis* in humans blood bank donors by serological and molecular techniques.

**Keywords:** *Ehrlichia*, *Anaplasma*, humans, dogs, white tail deer, ticks

La ehrlichiosis y la anaplasmosis son producidas por organismos pertenecientes al subgrupo  $\alpha$ -*Proteobacteria*, orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*, géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, respectivamente. Se caracterizan por ser bacterias intracelulares obligadas pequeñas (0.4 a 1.5 $\mu$ m), Gram-negativas, generalmente redondas, pero algunas veces altamente pleomórficas, que se replican dentro de una vacuola derivada de la membrana de la

célula eucariota del hospedero, vertebrado o invertebrado.<sup>1,2</sup>

Los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, infectan diferentes células hematopoyéticas, nombrándose a las enfermedades, según las células sanguíneas infectadas. *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* afectan monocitos y linfocitos, por el contrario *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum* tienen especial

<sup>1</sup>Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica; <sup>2</sup>Maestría en Enfermedades Tropicales, Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica; <sup>3</sup>Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica, Universidad de Costa Rica, Costa Rica; <sup>4</sup>Laboratorio de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.  
✉ gabyd@una.cr

tropismo por granulocitos, y *Anaplasma platys* predilección por las plaquetas. Las bacterias ingresan a las células sanguíneas por fagocitosis, y se alojan en vacuolas citoplasmáticas, en donde se dividen hasta formar colonias de bacterias conocidas como mórulas, característica distintiva de este grupo de patógenos.<sup>1-3</sup> Típicamente aparecen en las extensiones sanguíneas, como inclusiones de 2 a 7 mm de diámetro, redondeadas o elongadas, detectadas mediante diversas tinciones como Romanowsky, Wright y Giemsa.<sup>4,5</sup>

El tamaño del genoma de las especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* es relativamente pequeño (0.8 a 2.5Mb).<sup>2</sup> Los progresos en tecnología molecular han permitido avances en el desarrollo de análisis genéticos, indicando la verdadera posición filogenética de la mayoría de organismos del orden *Rickettsiales*, de tal manera que *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Ehrlichia ruminantium* y *Ehrlichia muris* han sido ubicadas dentro de un mismo género, por presentar una similitud de al menos 97.7% en su secuencia genética del segmento 16S de ARNr, mientras que *A. platys*, *A. phagocytophilum* y *Anaplasma bovis*, anteriormente reconocidos como miembros del género *Ehrlichia* (*E. platys*, *E. phagocytophila* y *E. bovis*), pasaron a formar parte del género *Anaplasma* por presentar similitudes de al menos 96.1% en sus secuencias genéticas del gen 16S de ARNr.<sup>1</sup>

En humanos se han reportado infecciones emergentes con *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *E. ewingii*, y *E. canis*.<sup>2</sup> En perros han sido reportados *E. canis*, *E. ewingii*, *A. platys*, *E. chaffeensis*, y *A. phagocytophilum*.<sup>6,7,8</sup>

*E. canis* fue la primera especie del género *Ehrlichia* reconocida y desde su descubrimiento en Argelia en 1935 por Donatien y Lestoquard ha sido identificada en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo ocasionando la ehrlichiosis monocítica canina (CME, por sus siglas en inglés). Inicialmente fue denominada como *Rickettsia canis*, y cobró mucha importancia durante la guerra de Vietnam por causar la muerte de cientos de perros militares.<sup>9</sup> Aunque originalmente se consideró como agente exclusivo de caninos, recientemente se discute su importancia como agente con potencial zoonótico, debido a la detección de infección en humanos de Venezuela con y sin asociación de signos clínicos,<sup>10,11</sup> además de evidencia serológica en humanos de Argentina<sup>12</sup> y de Brasil.<sup>13,14</sup>

*E. chaffeensis* fue descrita por primera vez en humanos de Estados Unidos por Maeda y colaboradores en 1987 quienes la caracterizaron equivocadamente como una nueva cepa de *E. canis*. Estudios posteriores revelaron su verdadera etiología, al ser aislada de un recluta de la Armada de Estados Unidos en Fort Chaffee, Arkansas, de donde adquirió su nombre.<sup>15</sup> Desde entonces, ha sido reconocida por causar la ehrlichiosis monocítica humana o HME (por sus siglas en inglés) y años más tarde se descubrió que también era capaz de infectar naturalmente a perros<sup>16</sup> y coyotes en Estados Unidos;<sup>17</sup> además, se reporta su presencia en cabras<sup>18</sup> y venados de cola blanca, confirmando a éstos últimos como reservorios naturales del agente, aunque muchas especies de vertebrados pueden servir como reservorios.<sup>19</sup> La mayoría de los casos de HME

se han reportado en Estados Unidos.<sup>20</sup> Hallazgos serológicos de *E. chaffeensis* en seres humanos en diferentes partes del mundo<sup>21,22</sup> deben de interpretarse con cuidado, ya que se reportan reacciones cruzadas entre *E. canis* y *E. chaffeensis*, y por otro lado, la garrapata vector está restringida a Norte América.<sup>23</sup>

*E. ewingii* es el agente etiológico de la ehrlichiosis granulocítica canina (EGC) o ehrlichiosis ewingii humana. Fue descubierta como causante de enfermedad en perros de Estados Unidos en 1971, pero no fue hasta 1985 que se le consideró como una especie distinta, ya que inicialmente se pensó que era una cepa de *E. canis* menos virulenta.<sup>24,25</sup> En 1999 se encontró de forma accidental en humanos de Estados Unidos, que presentaban síntomas de ehrlichiosis. Desde entonces se reportan casos en perros y humanos de Estados Unidos, en donde incluso estudios epidemiológicos la han descrito como la especie más prevalente en perros del estado de Missouri.<sup>26,27</sup> Fuera de América, existe un sólo reporte del agente en Camerún, donde se encontró en 2 perros naturalmente infectados.<sup>28</sup> Infecciones naturales han sido confirmadas en ciervos (*Odocoileus virginianus*), los cuales pueden ser importantes reservorios de este agente.<sup>29</sup>

*A. platys*, causante de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT, por sus siglas en inglés) fue reportado en perros por primera vez en Estados Unidos.<sup>30</sup> La enfermedad afecta solamente a caninos. A la fecha, no se ha encontrado en otras especies, incluyendo a los humanos.<sup>8</sup>

*A. phagocytophilum* es el agente causante de la anaplasmosis granulocítica humana (HGA, por sus siglas en inglés), y comprende los anteriores géneros de *Ehrlichia equi* y *Ehrlichia phagocytophila*.<sup>1</sup> Fue reportada por primera vez como patógeno en ovejas de Escocia en 1932, luego en caballos de Estados Unidos en 1969, y finalmente en perros de ese país en 1971 y 1982.<sup>7</sup> No fue hasta en 1990 que se describió por primera vez la enfermedad en seres humanos.<sup>4</sup> Afecta tanto a humanos, como a numerosas especies de animales domésticos y silvestres, entre las que se reportan perros, caballos, cabras, ovejas, gatos, rumiantes y animales silvestres, incluyendo aves, que podrían desempeñar un papel en la diseminación de la enfermedad.<sup>31,32</sup> Los reservorios de *A. phagocytophilum* se consideran sobre todo los roedores y los cérvidos. El agente se mantiene en la naturaleza en un ciclo biológico garrapata-mamífero-garrapata y los humanos son hospederos accidentales al ser infectados ocasionalmente por garrapatas portadoras de la bacteria.<sup>33</sup> Las diferencias en la preferencia de diversos hospedadores, en la variedad de manifestaciones clínicas y en la distribución geográfica del agente se atribuyen a la existencia de múltiples cepas de *A. phagocytophilum*.<sup>1</sup> En ciertos animales reservorios han sido evidenciadas recientemente cepas apatógenas para humanos, lo que hace reconsiderar el rol definitivo del venado cola blanca en el mantenimiento de cepas infectivas de *A. phagocytophilum*.<sup>34</sup>

### Transmisión y manifestaciones clínicas

Las garrapatas actúan como vectores biológicos de la ehrlichiosis y anaplasmosis, siendo *Rhipicephalus sanguineus*

el vector biológico de *E. canis*.<sup>35</sup> Experimentalmente, también se ha logrado la transmisión por *Dermacentor variabilis*.<sup>36</sup> La transmisión de este agente en la garrapata *R. sanguineus* ocurre transestadialmente.<sup>37</sup> La garrapata *Amblyomma americanum* sirve como vector biológico de *E. chaffeensis* y *E. ewingii*<sup>38,39</sup> y se sospecha de *D. variabilis*, debido a que el ADN de los dos agentes han sido detectados en dicha garrapata,<sup>40</sup> *E. ewingii* además ha sido encontrado en *R. sanguineus*; sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el posible rol de estas garrapatas como transmisores. Se sospecha que *A. platys* es transmitida por la garrapata *R. sanguineus*; sin embargo, el papel de esta garrapata, como vector biológico, no ha sido confirmado.<sup>30</sup> Como vectores de *A. phagocytophilum* se consideran sobre todo las garrapatas de los géneros *Ixodes* y *Amblyomma*.<sup>33</sup>

La garrapata adquiere el agente al alimentarse de animales que se encuentran en la fase aguda de la enfermedad y aún quizá en la fase subclínica.<sup>41,42</sup> Dentro del vector, la bacteria pasa del intestino a las glándulas salivales transmitiéndose a un nuevo hospedador cuando la garrapata se alimenta nuevamente. Estudios han comprobado que una garrapata adulta puede sobrevivir desde 155 hasta 568 días sin alimentarse y que posee capacidad de transmitir el agente hasta 155 días post infección.<sup>42</sup>

La CME se manifiesta en perros con síntomas como fiebre, depresión, anorexia y pérdida de peso en la fase aguda, encontrándose en el laboratorio trombocitopenia, leucopenia, anemia ligera e hipergamaglobulinemia. La fase crónica se caracteriza por hemorragia, epistaxis y edema.<sup>43</sup> La CME cursa en humanos con síntomas similares a los reportados para la HME.<sup>2, 11</sup>

*E. chaffeensis* produce en humanos una enfermedad aguda caracterizada por manifestaciones clínicas no específicas, principalmente presentando fiebre, dolor de cabeza, escalofrío, anorexia, vómitos y en algunos casos leucopenia, trombocitopenia y un elevado nivel de transaminasas hepáticas.<sup>15,23</sup> En perros naturalmente infectados no se han podido determinar signos clínicos significantes; sin embargo, un reporte de tres perros naturalmente infectados con *E. chaffeensis* documentó serios signos incluyendo vómitos, epistaxis, linfadenomegalia y uveítis.<sup>44</sup>

En el primer reporte de *E. ewingii* en humanos se reportó fiebre, dolor de cabeza, trombocitopenia y leucopenia, parece afectar sobre todo a personas inmunosuprimidas.<sup>26,33</sup> Los perros infectados con este agente presentan principalmente fiebre y trombocitopenia, pero también pueden mostrar ataxia y paresis, además la fase crónica ha sido asociada con poliartritis.<sup>27</sup>

La infección aguda con *A. platys* se caracteriza por una parasitemia en las plaquetas, seguida por episodios de trombocitopenia que ocurren en intervalos de 7 a 14 días,<sup>30</sup> rara vez ocurre hemorragia; sin embargo, trabajos realizados en Estados Unidos<sup>45</sup> y en Venezuela,<sup>46</sup> han reportado signos clínicos de mayor severidad, similares a aquellos asociados a infecciones con *E. canis*: disfunción de plaquetas, anemia, leucopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia.

El cuadro clínico de la angranulocítica humana es semejante al ocasionado por *E. chaffeensis* y *E. ewingii*. Usualmente, la enfermedad cursa con sintomatología febril, frecuentemente acompañada de anormalidades hematológicas (leucopenia y trombocitopenia), y elevación de las transaminasas hepáticas.<sup>34</sup> En todos los casos, la severidad de la infección dependerá de varios factores, entre los que se incluyen edad, estado del sistema inmune y variante de *A. phagocytophilum* involucrada.<sup>47,48</sup> En caninos y equinos los principales síntomas de la anaplasmosis granulocítica son fiebre, letargia, inapetencia, vómitos y diarrea. Menos frecuente se presenta cojera, polidipsia y hemorragias, edema de los miembros, ataxia, ictericia y los mismos hallazgos de laboratorio arriba mencionados.<sup>49, 50</sup> La alteración en la función neutrofílica y la leucopenia producida por la infección por *A. phagocytophilum* puede predisponer al desarrollo de infecciones oportunistas secundarias, que potencialmente pueden ser causa de mortalidad.<sup>50</sup>

## Diagnóstico

Para el diagnóstico de la ehrlichiosis y anaplasmosis se emplean diversas técnicas laboratoriales que incluyen: la identificación de mórulas o cuerpos de inclusión en frotis sanguíneos<sup>51</sup> y la detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).<sup>22</sup> Recientemente se ha incrementado el uso de técnicas moleculares tales como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La secuenciación y el aislamiento primario en cultivo celular son otras técnicas empleadas en casos importantes y generalmente para fines de investigación.<sup>11</sup>

El método más simple, rápido y económico para detectar la bacteria, es la visualización de la mórula en células de sangre periférica; sin embargo, es también la técnica menos sensible e inespecífica, debido a que no se detectarán bajas cantidades circulantes de bacterias en sangre, y en ocasiones, es posible encontrar inclusiones no relacionadas a *Ehrlichia* y *Anaplasma* que pueden causar confusión en el diagnóstico.<sup>52</sup> Finalmente, esta técnica no permite la diferenciación entre las diferentes especies de la familia *Anaplasmataceae*, por presentar una morfología idéntica y poseer tropismo por las mismas células.<sup>1</sup>

Actualmente hay disponibles pruebas serológicas inmunoenzimáticas e inmunofluorescentes de excelente sensibilidad, especificidad y confiabilidad, pero los anticuerpos generalmente están ausentes durante las dos **primeras semanas de aparición de los síntomas de la enfermedad**, y pueden persistir hasta ocho meses después de la eliminación del agente del organismo. También es posible que se presenten reacciones cruzadas entre los miembros de la familia *Anaplasmataceae*, y con otros agentes rickettsiales, ocasionando así diagnósticos poco precisos. Solamente un incremento o una disminución de 4 veces en el título de anticuerpos en sueros pareados tomados con 4 semanas de diferencia se considera como diagnóstico confirmatorio para casos clínicos de ehrlichiosis y anaplasmosis.<sup>33</sup>

En cuanto al aislamiento de estas bacterias mediante cultivo celular, ésta sigue siendo la prueba de oro para confirmar el diagnóstico; sin embargo, implica un proceso de incubación de

varias semanas, requiere de laboratorios de seguridad grado 3 y personal especializado, resultando además ser una técnica muy laboriosa y poca sensible.<sup>33, 34</sup> Además, en el caso de *E. ewingii* no se ha logrado su cultivo celular.<sup>16</sup>

En los últimos años, las técnicas moleculares han ganado aceptación como un método importante para la detección de agentes rickettsiales, implementándose muchos protocolos de investigación, esto debido a que son métodos altamente sensibles, específicos, rápidos y confiables. El PCR 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, permite determinar el estado de portador y diferenciar entre las especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*.<sup>6,40,41,44</sup> Además, debido a la imposibilidad de aislar *E. ewingii* en cultivo celular, el diagnóstico de la infección con este agente puede ser determinado solamente con el uso de técnicas moleculares.<sup>26</sup>

La técnica de PCR convencional basada en la amplificación de regiones del gen *16S ARNr* de *Ehrlichia* y *Anaplasma* ha demostrado efectividad en muestras de sangre de humanos y animales, reportándose un límite de detección de 20pg para *Ehrlichia*,<sup>16,53,33</sup> y se han obtenido aún mejores resultados utilizando técnicas de PCR de tipo anidado, que han incrementado la sensibilidad de la prueba hasta un límite de detección de 0.2 pg de ADN.<sup>54,55,56</sup> Para *Ehrlichia* spp. también se emplea una técnica de PCR basada en la amplificación del gen *dsb* (gen Thio-Disulfido Oxireductasa). El producto de las reacciones puede utilizarse para fines de secuenciación.<sup>28,55</sup>

### Tratamiento y profilaxis

Se cree que un posible mecanismo mediante el cual *Ehrlichia* sobrevive dentro de la célula, es inhibiendo la fusión fagosoma-lisosoma, efecto que es restaurado tras la administración de doxiciclina. También existen otras drogas con comprobada eficacia como tetraciclina, oxitetraciclina, y cloranfenicol.<sup>42</sup> Se recomienda administrar doxiciclina como tratamiento de elección en seres humanos cada 12 horas durante 14 días.<sup>33</sup> Para perros el protocolo recomendado es de 10mg/Kg una vez al día por 28 días;<sup>57</sup> sin embargo, Harrus *et al.*<sup>44</sup> encontraron que este tratamiento elimina el agente en 16 días. En la mayoría de los casos, los perros en fase aguda de la enfermedad responden al tratamiento con doxiciclina dentro de 24 a 72 horas posteriores a la primera administración. Por otro lado, el tratamiento para animales que se encuentran en la fase subclínica y crónica de la enfermedad debe ser aún evaluado, ya que perros subclínicamente infectados pueden permanecer portadores aún después de 6 semanas de tratamiento con doxiciclina<sup>41</sup> y solamente existe un reporte de tratamiento exitoso con recuperación de la fase crónica de la enfermedad.<sup>42</sup> El único método profiláctico existente es el control del vector.

### Ehrlichiosis en Costa Rica

El agente causal de la CME se reportó por primera vez en Costa Rica en 1995, por medio del hallazgo de cuerpos de inclusión

y mórulas en leucocitos de caninos infectados, confirmándose estos hallazgos por medio de IFI en muestras de suero de los caninos previamente diagnosticados.<sup>58</sup> Durante muchos años la CME fue detectada rutinariamente en caninos mediante frotis sanguíneos y serología, considerándose una enfermedad endémica en el país, con casos constantes y aumentos durante ciertos periodos del año (Marzo – Abril, Agosto – Setiembre), cuando las condiciones climáticas, generaban un ambiente propicio para el desarrollo y supervivencia del vector (Dra. Ana Meneses Guevara, comunicación personal).

Fue hasta en el año 2005 que se diagnosticó en el Sistema de Salud de Costa Rica el primer caso de ehrlichiosis en una niña de Santa Ana; San José, que presentaba fiebre, manifestaciones cutáneas y neurológicas, y cuya muestra, así como la de los perros que convivían con ella, se enviaron al Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en Atlanta, determinándose la presencia de *Ehrlichia* spp. en la sangre de los caninos. A la niña se le trató exitosamente con antibióticos (Dra. Gaby Dolz, comunicación personal).

Un estudio realizado en 2006, encontró 70% de casos seropositivos en 30 perros sospechosos de sufrir ehrlichiosis utilizando un inmunoensayo enzimático comercial (Tesis de Grado, UNA. Prevalencia serológica y citológica de la ehrlichiosis canina en Costa Rica. Mónica Rímolo, 2006).

En el 2007 se reportaron en Costa Rica dos casos clínicos de ehrlichiosis granulocitotrópica humana en dos hospitales diferentes del Valle Central de Costa Rica, basados en el cuadro clínico y la presencia de mórulas granulocíticas en sangre periférica.<sup>59,60</sup> Estos hechos ocasionaron que la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) incorporara esta patología en el diagnóstico diferencial de las enfermedades febriles.<sup>60</sup>

El diagnóstico molecular, la caracterización y el aislamiento celular de *E. canis* en perros de Costa Rica se logró por primera vez en el 2010<sup>61</sup>. Romero y colaboradores lograron amplificar mediante PCR *16S ARNr* anidado, ocho muestras sanguíneas de caninos con sintomatología compatible a ehrlichiosis, resultando positivas para *E. canis*. La secuenciación de parte del gen *dsb* de esas ocho muestras y su análisis a través del BLAST mostró 100% de identidad con todos los aislamientos de *E. canis* depositados en el GenBank, además se logró aislar cuatro de estas muestras mediante cultivo celular.<sup>61</sup> Se logró detectar además ADN de *E. canis* en un 47.7% (148/310) de muestras sanguíneas provenientes de perros con sintomatología sugestiva de CME de diferentes provincias de Costa Rica (San José 17%, Alajuela 38%, Heredia 15%, sin datos geográficos 30%) utilizando el PCR *16S ARNr* anidado. En ninguna de las muestras procesadas se detectó ADN de *E. chaffeensis* o *E. ewingii*.<sup>61</sup>

Al comparar los resultados del diagnóstico de *E. canis* obtenidos mediante frotis sanguíneo y PCR en sangre de perros del Valle Central de Costa Rica con sintomatología sospechosa de CME, solamente en 103 (57,9%) de los casos positivos en frotis sanguíneo se logró el diagnóstico molecular de *E. canis*, mientras que de las 122 muestras reportadas negativas (sin inclusiones) un 36,0% (44) de los casos resultaron positivas

en la técnica de PCR. Para la prueba de frotis sanguíneo se determinó una sensibilidad del 70,1%, especificidad del 51,0%, valor predictivo positivo de 57,9% y valor predictivo negativo de 63,9%, comparado con la técnica de PCR. El análisis de regresión logística con la información recolectada de los animales reveló asociación positiva ( $p < 0,05$ ) con la presencia de inclusiones, pero no con la edad o el sexo del animal; mientras que la aplicación de la prueba t-student detectó diferencias altamente significativas en los promedios de las variables de hematocrito y hemoglobina entre perros PCR positivos y perros PCR negativos a *E. canis*.<sup>62</sup> De 30 muestras evaluadas previamente mediante serología, solamente un 25,0% de los casos seropositivos y un 36,4% de los casos seronegativos resultaron positivos en el diagnóstico molecular de *E. canis*. El trabajo concluye, que el hallazgo de valores bajos de hematocrito y hemoglobina en combinación con signos clínicos y la detección de inclusiones en muestras sanguíneas representan un fuerte indicio de infección con ehrlichiosis; sin embargo, es necesaria la aplicación de una técnica molecular como método diagnóstico confirmativo.<sup>62</sup>

En el trabajo realizado por Ábrego *et al.*<sup>63</sup> se analizó mediante PCR la presencia de *A. platys* en 300 muestras sanguíneas provenientes de perros atendidos en clínicas veterinarias del Valle Central de Costa Rica. Un total de 19 (6.33%) muestras de diferentes áreas geográficas (San José, Heredia, Alajuela, Cartago y Guanacaste) resultaron positivas a *A. platys*. En 7 muestras caninas se encontró además infección mixta (*A. platys* y *E. canis*). Una muestra sanguínea positiva a *A. platys* fue secuenciada mostrando una similitud del 100%.<sup>63</sup> En tres de estas muestras se detectó además ADN de *A. phagocytophilum*, una muestra provenía de un perro de Jacó, Puntarenas, mientras que de las otras dos muestras no se pudo obtener su procedencia.<sup>64</sup> *A. phagocytophilum* fue sin embargo, reportado por primera vez en Costa Rica por Soto (Tesis de Posgrado UNA. Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, *Ehrlichia ewingii*, y *Anaplasma phagocytophilum* en garrapatas y venados de Costa Rica. José Luis Soto Rivas. 2010). En este estudio se analizaron 34 muestras de sangre de venados cola blanca, por medio de PCR, encontrándose el agente en un venado de San Carlos. La secuenciación de la muestra confirmó los hallazgos.

Por otro lado, estudios realizados con 160 garrapatas recolectadas de perros, detectaron por PCR anidado *E. canis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* en 43 (26.87%), 5 (3.12%) y 2 (1.25%) garrapatas *R. sanguineus*, respectivamente, siendo éste el primer reporte de la presencia de estos agentes en garrapatas de Costa Rica. Dos garrapatas presentaron además infecciones mixtas con *E. canis* y *A. platys*. Las garrapatas positivas a *E. canis* provenían de San José, Heredia, Alajuela y Cartago, las positivas a *A. platys* de Heredia y Alajuela, y las positivas a *A. phagocytophilum* de San José y Heredia.<sup>64,65</sup>

En el trabajo realizado por Bouza-Mora (Tesis de Posgrado UCR. Uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunofluorescencia indirecta (IFA) como técnicas de diagnóstico confirmatorio para *Ehrlichia* spp en donadores de Bancos de Sangre. Laura Bouza-Mora. En preparación) en donadores de Bancos de Sangre de Costa Rica, se determinó anticuerpos contra *E. canis* en 35 de 100 sueros analizados

utilizando IFI; de ellos, 30 (85,7%) evidenciaron títulos bajos (1:64 a 1:256), mientras que en 5 (14,3%) se determinaron títulos altos (1:1024 a 1:8192). El 68.6% (24/35) de las muestras positivas correspondió al sexo femenino. En ambos sexos las edades coincidieron entre los 18 y los 35 años. Mediante PCR se detectaron 15 (5.3%) muestras de un total de 280 analizadas mediante *dsb* PCR como positivas. La secuenciación determinó en 10 muestras la presencia de *E. canis*.

En el 2011 se vuelven a reportar dos casos clínicos de ehrlichiosis humana en el Sistema de Salud de Costa Rica, basados en el cuadro clínico y la presencia de mórulas monocíticas en sangre periférica, los pacientes responden adecuadamente al tratamiento con doxiciclina.<sup>66</sup> Hasta la fecha, el diagnóstico de anaplasmosis y ehrlichiosis en el Sistema de Salud incluye solamente la observación de inclusiones en las células sanguíneas utilizando las tinciones de Giemsa y Wright, ya que se carece de técnicas diagnósticas sensibles y específicas como IFI, cultivo celular o técnicas moleculares.<sup>59,60</sup> Los estudios realizados hasta la fecha demuestran la presencia de *E. canis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* en hospedadores, reservorios y vectores de Costa Rica, además de que se evidencia una amplia distribución en el país. Se recomienda realizar más estudios y establecer el diagnóstico molecular de estos agentes en los Sistemas de Salud de Costa Rica.

**Agradecimientos y colaboradores:** Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE), por aportar el financiamiento de la presente investigación (Fondos del Sistema), al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por la beca de estudio otorgada a Leyda Ábrego y Luis Romero, y al Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) por el apoyo brindado a la Red Iberoamericana para la Investigación y Control de las Enfermedades Rickettsiales (RIICER-CYTED). Un especial agradecimiento al Dr. Ganta, Dr. Labruna, Dr. Aguiar, y a todos los veterinarios que participaron en esta investigación.

---

## Referencias

---

1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, *et al.* Reorganization of genera in the families' *Rickettsiae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: Unification of some species of *Ehrlichia* and *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51:2145-2165.
2. Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 2010; 30:261-92.
3. Rikihisa Y. The tribe *Ehrlichieae* and *ehrlichial* diseases. Clin Microbiol Rev 1991; 4:286-308.
4. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 1994; 32:589-595.
5. Rikihisa Y. New findings on members of the family *Anaplasmataceae* of veterinary importance. Ann NY Acad Sci 2006; 1078:438-445.

#### IV Congreso latinoamericano de enfermedades rickettsiales. San José, 2013

6. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol 1998; 36:2645-2651.
7. Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol 2010; 167:108-122.
8. Gaunt SD, Beall MJ, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrashekar R. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. Parasit Vectors 2010; 3:33.
9. Keefe TJ, Holland CJ, Salyer PE, Ristic M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. J Am Vet Med Assoc 1982; 181:236-238.
10. Pérez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol 1996; 34:2133-2139.
11. Pérez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. Ann NY Acad Sci 2006; 1078:110-117.
12. Ripoli CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, et al. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. Am J Trop Med Hyg 1999; 61:350-354.
13. Calic SB, Galvao MA, Bacellar F, Rocha CM, Mafra CL, Leite RC, et al. Human ehrlichiosis in Brazil: First suspect cases. Brazil J Infect Dis 2004; 8:259-262.
14. Labruna MB, McBride JW, Camargo LMA, Aguiar DM, Yabsley MJ, Davidson WR, et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. Vet Parasitol 2007; 143:189-195.
15. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1991; 29:2838-2842.
16. Dawson JE, Biggie KL, Warner CK, Cookson K, Jenkins S, Levine JF, et al. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. Am J Vet Res 1996; 57:1175-9.
17. Kocan AA, Levesque GC, Whitworth LC, Murphy GL, Ewing SA, Barker RW. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. Emerg Infect Dis 2000; 6:477-80.
18. Dugan VG, Little SE, Stallknecht DE, Beall AD. Natural infection of domestic goats with *Ehrlichia chaffeensis*. J Clin Microbiol 2000; 38:448-9.
19. Lockhart JM, Davidson WR, Stallknecht DE, Dawson JE, Howerth EW. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. J Clin Microbiol 1997; 35:1681-1686.
20. McQuiston JH, Paddock CD, Holman RC, Childs JE. The human ehrlichiosis in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5:635-642.
21. Keysary A, Amram L, Keren G, Stoegeer Z, Potasman I, Jacob A, et al. Serologic evidence of human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Israel. Emerg Infect Dis 1999; 5:775-778.
22. Moro PL, Shah J, Li O, Gilman RH, Harris N, Moro MH. Short report: serologic evidence of human ehrlichiosis in Peru. Am J Trop Med Hyg 2009; 80:242-244.
23. Paddock CD, Childs JE. *Ehrlichia chaffeensis*: A prototypical emerging pathogen. Clin Microbiol Rev 2003; 16:37-64.
24. Ewing SA, Roberson WR, Buckner RG, Hayat CS. A new strain of *Ehrlichia canis*. J Am Vet Med Assoc 1971; 159:1771-1774.
25. Stockham SL, Schmidt DA and Tyler JW. Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from central Missouri: a possible cause of polyarthritis. Vet Med Review 1985; 6:3-5.
26. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikihisa Y. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med 1999; 341:148-155.
27. Liddell AM, Stockham SL, Scott MA, Sumner JW, Paddock CD, Gaudreault-Keener M. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. J. Clin. Microbiol 2003; 41:4617-4622.
28. Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Dickmu VL, Fokam EB, Walker DH. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. Vet Microbiol 2005; 111:59-66.
29. Yabsley MJ, Varela AS, Tate CM, Dugan VG, Stallknecht DE, Little SE. *Ehrlichia ewingii* infection in White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Emerg Infect Dis 2002; 8:668-671.
30. Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. J Infect Dis 1978; 137:182-188.
31. Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. J Wildl Dis 2004; 40:639-659.
32. Ogden NH, Lindsay LR, Hanincova K, Barker K, Bigras-Poulin M, Charron DF, et al. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74:1780-1790.
33. Oteo JA, Brouquib P. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23:375-380.
34. Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2009; 7:709-722.
35. Groves, MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Am J Vet Res 1975; 36:937-940.
36. Johnson EM, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Crow DW, Kocan K. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (*Acari: Ixodidae*). Vet Parasitol 1998; 74:277-288.
37. Smith RD, Sells DM, Stepheson EH, Ristic MH, Huxsoll DL. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia and its differentiation from a symbiotic rickettsia. Am J Vet Res 1976; 37:119-126.
38. Anziani OS, Ewing SA, Barker RW. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe *Ehrlichieae* by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. Am J Vet Res 1990; 51:929-931.
39. Ewing SA, Dawson JE, Kocan AA, Barker RW, Warner CK, Panciera RJ. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (*Acari: Ixodidae*). J Med Entomol 1995; 32:368-374.

40. Murphy GI, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 1998; 79:325-339.
41. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:73-76.
42. Waner T, Harrus S. Canine monocytic ehrlichiosis. Recuperado el 16 de octubre de 2007, de <http://www.ivis.org>
43. Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AWCA. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2745-2749.
44. Harrus S, Waner T, Mahan S, Bark H. Rickettsiales. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infection in animals. Blackwell Publishing, USA, 2004: 425-444.
45. Wilson JF. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1992; 28:381-383.
46. Arraga-Alvarado C, Palmar M, Parra O, Salas P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. *Vet Pathol* 2003; 40:149-156.
47. Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, et al. Deer-associated infection study group. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and lyme disease *Clin Infect Dis* 2002; 34:1184-1191.
48. Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum*: the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Comm* 2007; 31:79-84.
49. Kohn B, Galke D, Beeliz P, Pfister K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22:1289-1295.
50. Carrade D, Foley J, Borjesson D, Sykes J. Canine granulocytic Anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 2009; 23:1129-1141.
51. Hildebrandt PK, Conroy JD, McKee AE, Nyindo MBA, Huxsoll DL. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect Immun* 1973; 7:265-271
52. Beaufils JP, Inokuma H, Martin-Granel J, Jumelle P, Barbault-Jumell M, Brouqui P. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. *Rev Med Vet* 2002; 153:85-90.
53. Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1658-1662.
54. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, et al. Comparison of nested PCR with Immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1852-1855.
55. Massung R, Slater K, Owens J, Nicholson W, Mather T, Solberg V, et al. Nested PCR assay for detection of Granulocytic Ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1090-1095.
56. Martin, AR, Brown GK, Dunstan RH, Roberts TK. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Parasitol* 2005; 109:176-180.
57. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med* 2002; 16:309-315.
58. Meneses A. 1995. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *Vet Rec* 1995; 137:46-47.
59. Rojas-Solano JR, Villalobos-Vindas J. Ehrliquisis granulocitotrópica humana. *Acta Med Costarric* 2007; 49:121-123.
60. Hernández-de Mezerville V, Padilla-Cuadra J. Choque séptico por ehrlichiosis. *Acta Med Costarrica* 2007; 49:118-120.
61. Romero LE, Meneses AI, Salazar L, Jiménez M, Romero JJ, Aguiar DM, et al. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res Vet Science* 2011; 91:95-97.
62. Romero LE, Dolz G, Romero JJ, Meneses A, Jiménez M, Salazar L. Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias* (en prensa).
63. Ábrego L, Dolz G, Romero JJ, Vargas B, Meneses A. Detección molecular de *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 2009; 27:71-80.
64. Ábrego L, Jiménez AE, Romero JJ, Montenegro V, Pereira R, Salazar L, et al. Detección de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma platys* y *Borrelia burgdorferi* s.l. en garrapatas colectadas de perros en Costa Rica. En: XV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria "Salud Animal para el Bienestar Humano", San José, Costa Rica, 18-20 noviembre, 2009.
65. Campos L, Dolz G, Salazar L, Romero JJ. Detección molecular del agente zoonótico *Anaplasma phagocytophilum* en muestras de sangre de perros y garrapatas de perros de Costa Rica. En: Segundo Congreso de Investigación de la Red Centroamericana de Exbecarios del DAAD para la Investigación, León, Nicaragua, 30 noviembre-2 diciembre, 2011.
66. Brenes Valverde D, Brenes Martínez S, Quirós Rojas I. Ehrliquisis: Reporte de 2 casos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 2011; 598:315-318.