

Análisis filogenético de *Neorickettsia risticii* detectada en murciélagos de Argentina

Phylogenetic analysis of *Neorickettsia risticii* detected in bats, Argentina

CICUTTIN, G.L.¹ & GREIMAN, S.E.²

¹Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (ZBPTV-IZLP), Laboratorio de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias Transmitidas por Vectores. ²Department of Biology, Georgia Southern University (USA).

RESUMEN

La fiebre equina del Potomac (ehrlichiosis monocítica equina) es causada por *Neorickettsia risticii* (anteriormente *Ehrlichia risticii*), con casos clínicos notificados solamente en EEUU, Canadá, Brasil y Uruguay. *Neorickettsia risticii* es un endosimbionte de trematodos que presentan un complejo ciclo de vida con varios hospedadores como artrópodos, caracoles acuáticos y vertebrados insectívoros. Distintos estudios filogenéticos revelaron que se compone de diversas cepas en EEUU, pero no se cuenta con información disponible de Brasil y Uruguay. En nuestro país, *N. risticii* se detectó por primera vez en 2013 en murciélagos *Tadarida brasiliensis* procedentes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar filogenéticamente a *N. risticii* detectada en CABA anteriormente. Se estudiaron tres muestras de ADN previamente obtenidas resultando positivas mediante una PCR anidada para un fragmento del ARNr 16S del género *Neorickettsia*. Las secuencias tuvieron un 100 % de similitud entre ellas y 99,5 a 99,7 % con distintos hallazgos de *N. risticii* en EEUU. Sólo una muestra pudo ser amplificada con la PCR anidada de un fragmento del gen *groESL* y el análisis filogenético reveló que *N. risticii* hallada en CABA se relaciona con hallazgos de la costa oeste de EEUU. Dado el potencial impacto en medicina veterinaria, la caracterización molecular de *N. risticii* circulante en Sudamérica es de suma importancia. Además, la circulación de este patógeno en nuestro país hace necesario realizar estudios adicionales para comprender la ecología y transmisión de *N. risticii*, y detectar la aparición de casos equinos.

Palabras clave: (*Neorickettsia risticii*), (ehrlichiosis monocítica equina), (fiebre equina del Potomac), (murciélagos), (Argentina)

Correspondencia e-mail: Gabriel Cicuttin gcuttin@gmail.com

Recibido: 06-04-2016

Aceptado: 01-07-2017

ABSTRACT

Potomac horse fever (equine monocytic ehrlichiosis) is caused by *Neorickettsia risticii* (formerly *Ehrlichia risticii*), with clinical cases reported only in the USA, Brazil and Uruguay. *N. risticii* is an endosymbiont of flukes with a complex life cycle utilizing various hosts such as aquatic snails and arthropods, and vertebrate insectivores. Different phylogenetic studies revealed that *N. risticii* consists of various strains in the USA, but no information is available from Brazil and Uruguay. In our country, *N. risticii* was first detected in 2013 in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires city (CABA). The aim of our study was to characterize phylogenetically *N. risticii* detected in CABA. The three DNA samples previously obtained were positive by nested-PCR for a fragment of 16S rRNA of *Neorickettsia* genus and were sequenced, resulting in a 100% similarity among them and 99.5 to 99.7% with various strains of *N. risticii* from USA. Only one sample could be amplified by nested-PCR for a fragment of *groESL* gene. Phylogenetic analysis revealed that the current strain is related to strains of *N. risticii* along the west coast of the USA. Given the potential impact of veterinary medicine, molecular characterization of *N. risticii* circulating in South America is of great importance. In addition, the circulation of this pathogen in our country requires additional studies to understand the ecology and transmission of *N. risticii*, and detecting the occurrence of equine cases.

Key words: (*Neorickettsia risticii*), (equine monocytic ehrlichiosis), (Potomac horse fever), (bats), (Argentina)

INTRODUCCIÓN

Neorickettsia risticii (anteriormente *Ehrlichia risticii*) es el agente de la fiebre equina del Potomac (ehrlichiosis monocítica equina), una enfermedad del verano descrita a fines de los 70s en los condados rurales de Maryland y Virginia cerca del río Potomac (Washington, EEUU)¹. Los signos clínicos son variados, pero usualmente incluyen fiebre (a menudo bifásica), depresión, anorexia y colitis con diarrea aguda. En casos graves, los caballos presentan laminitis y las hembras pueden abortar^{1,4,7,16}. La letalidad varía del 5 al 30 % en animales sin tratar⁴. Hasta la actualidad, se han notificado casos clínicos sólo en EEUU, Canadá, Brasil y Uruguay^{5,7,16}. Interesantemente, en Brasil y Uruguay durante casi 100 años se ha conocido la ocurrencia de una enfermedad diarreica en caballos durante el verano en las costas del lago Merín. Esta enfermedad es denominada localmente como churrido equino y fue descrita en 1948⁶.

Neorickettsia risticii es una bacteria intracelular obligada endosimbionte de trematodos principalmente de los géneros *Acanthatrium* y *Lecithodendrium*. El ciclo de vida

de estos parásitos es complejo e involucra varios hospedadores, incluyendo caracoles acuáticos, artrópodos acuáticos y vertebrados. En general, el ciclo de vida comienza cuando un caracol acuático ingiere un huevo del parásito, el huevo eclosiona y el miracidio penetra los tejidos del caracol, desarrollando a un esporoquiste primario. El esporoquiste primario produce esporoquistes secundarios a través de reproducción asexual, estos esporoquistes se extienden por todos los tejidos del caracol y producen miles de cercarias. Las cercarias salen del caracol y entran en el ambiente externo, donde pueden penetrar en un artrópodo acuático y enquistarse en forma de metacercarias. Cuando los murciélagos y aves insectívoras ingieren los artrópodos infectados por metacercarias, los trematodos adultos se desarrollan en su intestino^{1,13,16,17}. Complementariamente, se ha demostrado que *N. risticii* puede ser transmitida horizontalmente, de los trematodos infectados a tejidos no parasitados (como hígado y bazo) de aves y murciélagos, sugiriéndose que los animales insectívoros también podrían ser reservorios^{7,14,16}.

La transmisión de *N. risticii* a los equinos ocurre cuando ingieren accidentalmente insectos infestados con metacercarias (infectadas con *N. risticii*) durante el pastoreo o comiendo heno, o al beber insectos que con el agua. También es posible que los caballos puedan adquirir la enfermedad al ingerir cercarias con el agua de bebida¹⁶.

Neorickettsia risticii se compone de diversas cepas en distintas regiones, según indican estudios realizados por caracterización molecular de genes ARNr 16S, *groESL*, *p51*, análisis de *Western blot* y morfología^{4,6,11}. Las posibles explicaciones para esta amplia variación molecular incluyen los sistemas defectuosos de reparación de ADN, tanto en *N. risticii* como en *Neorickettsia sennetsu*, lo cual daría lugar a mayores tasas de mutación para el género *Neorickettsia*, coincidiendo con los cambios temporales y la ocurrencia de cepas atípicas de *N. risticii*. Además, la variación genética de *N.*

risticii podría haber surgido debido a presiones selectivas sobre los trematodos infectados y/o los hospedadores de los trematodos⁸.

En Argentina, *N. risticii* se detectó por primera vez en 2013 en tres murciélagos *Tadarida brasiliensis* procedentes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), a partir de muestras de hígado, bazo y pulmón, utilizándose una PCR que amplificaba un fragmento de 345 pb de ARNr 16S², siendo esta la única información genética de *N. risticii* disponible para Sudamérica. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar filogenéticamente a *N. risticii* detectada en el estudio previo de 2013.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron tres muestras de ADN positivos detectados en 2013 utilizando dos PCRs anidadas para el género *Neorickettsia*: la primera dirigida al ARNr 16S^{9,10} y la segunda dirigida al gen *groESL*¹² (Tabla 1).

PCR	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Fragmento (pb)	
ARNr 16s	Externos	N16S-25F	TCAGAACGAACGCTAGCGGT	1470
		N16S-1500R	AAAGGAGGTAATCCAGCCGCAGGTTAC	
	Internos	N16S-50F	TAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACG	1371
		N16S-1400R	CGGTTAGCTCACTAGCTTCGAGTAA	
<i>groESL</i>	Externos	HS10F	CTCAAATGAAACAAT-CCGTTTGTGGTGTAGC	1940
		HS2090R	CATTCCACCCATGCCA-CCACCAGGCAT	
	Internos	HS90F	GTAGGTCTTGAAAAATATCACAGCG	1893
		HS2030R	GTAGTCACTAGAACACTAGCAACAGA	

Tabla 1. Detalle de los cebadores utilizados

Ambas reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 25 µl utilizando OneTaq Quick-Load 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts), siguiendo las instrucciones del fabricante. El termociclado se realizó en un termociclador EP Gradient Mastercycler (Eppendorf, Hauppauge, New York) utilizando una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos

con una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 1 minuto con 45 segundos, para finalizar con una extensión a 68°C por 5 minutos. Como control positivo se utilizó *Neorickettsia* sp. endosimbionte de *Plagiorchis elegans*¹¹ y como control negativo se usó agua libre de nucleasas.

Los productos amplificados fueron purificados utilizando Zymo DNA Clean & Concentrator

(Zymo Research, Irvine, CA) o ExoSap PCR clean-up enzymatic kit from Affimetrix (Santa Clara, CA) según las instrucciones del fabricante, y fueron secuenciados en un secuenciador ABI Prism 3100. Las secuencias fueron ensambladas usando el software Sequencher 4.2 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, MI). El análisis de alineamiento múltiple fue realizado con el algoritmo CLUSTAL y la construcción del árbol filogenético fue hecha con el software MEGA versión 6 usando el método del vecino más cercano (*neighbour-joining*, NJ) y los parámetros del modelo Tamura Nei. Los valores de confianza para cada rama de los árboles resultantes fueron determinados mediante 1000 repeticiones de remuestreo (*bootstrap*). En el caso del gen *groESL* el análisis filogenético se realizó sobre un fragmento parcial de 526 pb para los cuales se disponía de varias secuencias en GenBank para comparar.

Las secuencias obtenidas en este estudio fueron depositadas en GenBank con los siguientes números de acceso: KX001784 (fragmento del ARNr 16S) y KX001785 (fragmento del gen *groESL*).

RESULTADOS

Las tres muestras resultaron positivas para *N. risticii* mediante la PCR anidada del fragmento del ARNr 16S y fueron secuenciadas, resultando en un 100 % de similitud entre ellas, 99,7 % (1305/1309) a 99,6 % (1304/1309) con

distintos hallazgos de *N. risticii* en California (AF206300 y AF036654, AF037211 y AF37210, respectivamente) y 99,5 % (1303/1309) con *N. risticii* cepa Illinois (Maryland, CP001431) y *N. risticii* de Ohio (AY005439). La relación filogenética se muestra en la figura 1.

Sólo una muestra pudo ser amplificada con la PCR anidada del fragmento *groESL*. La secuencia resultante tuvo una similitud del 97,5 % (1812/1858) con *N. risticii* cepa Illinois (CP001431). Además considerando un fragmento parcial de 526 pb con mayor disponibilidad en GenBank, presentó una identidad del 98,3 % (517/526) y 98,1 % (516/526) con distintas secuencias de *N. risticii* de California (AF036665 y AF037213, respectivamente), 97,9 % (515/526) con *N. risticii* de Oregon (AF036670 y AF036660) y California (AF036663), 97,7 % (514/526) con hallazgos en Oregon (AF36661) y 97,3 % (512/526) con hallazgos en California (AF193413 y AF036662) y Pensilvania (AF036664). Además, tuvo una mayor diferencia con otros hallazgos en el centro-este de EEUU. El análisis filogenético del fragmento *groESL* se detalla en la figura 2.

Lamentablemente no se encuentran secuencias genéticas disponibles para su comparación de *N. risticii* halladas en Brasil y Uruguay, así como de hallazgos previos en murciélagos en EEUU.

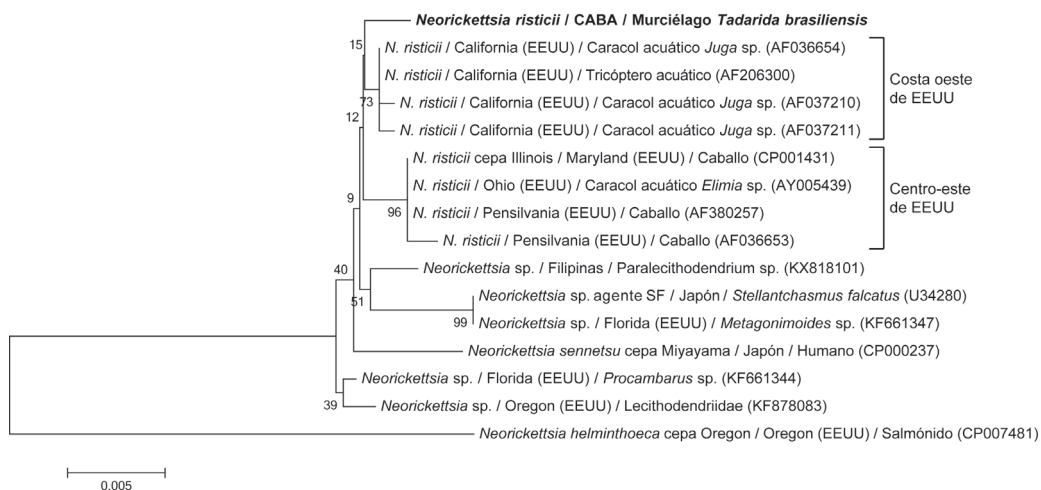


Figura 1. Árbol filogenético inferido por la comparación de secuencias parciales del ARNr 16S de *Neorickettsia risticii*. Los números en los nodos son los valores de soporte. La barra de escala representa la diferencia en nucleótidos de las secuencias.

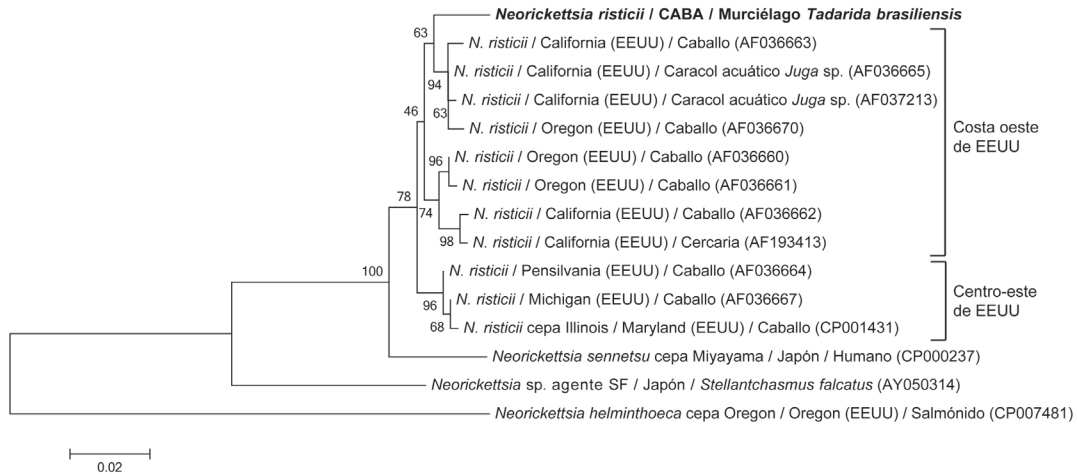


Figura 2. Árbol filogenético inferido por la comparación de secuencias parciales del gen *groESL* de *Neorickettsia risticii*. Los números en los nodos son los valores de soporte. La barra de escala representa la diferencia en nucleótidos de las secuencias.

DISCUSIÓN

Este es el primer análisis filogenético de *N. risticii* hallada en Sudamérica. El uso de dos fragmentos génicos (ARNr 16S y *groESL*) permitió develar la relación filogenética de *N. risticii* presente en nuestra región respecto a hallazgos previos en EEUU. En este sentido, a medida que más información se acumula respecto a las distintas variantes de *N. risticii* que circulan en distintos lugares, es posible detectar patrones regionales en las asociaciones de estos endosimbiontes y los trematodos hospedadores, y con ello definir nichos ecológicos específicos de transmisión¹⁶. Por otra parte, la única información genética previa de *N. risticii* disponible para Sudamérica era un fragmento de 345 pb del ARNr 16S obtenido de murciélagos *T. brasiliensis* en CABA². La descripción de *N. risticii* infectando caballos en Sudamérica (Brasil y Uruguay) utilizó enzimas de restricción sobre una PCR de un fragmento ARNr 16S⁶, no habiendo secuencias genéticas disponibles para su comparación. A su vez, otro estudio realizado en Brasil en trematodos *Parapleurolophocercus* sp. utiliza también una PCR para un fragmento 16S ARNr pero sin secuenciar los productos obtenidos³. Por último, no hay secuencias genéticas disponibles (ARNr 16S y *groESL*) de hallazgos previos en murciélagos (*Myotis yumanensis*¹⁴, *Myotis*

lucifugus y *Eptesicus fuscus*⁷) estudiados en EEUU.

La mayoría de los estudios de diversidad genética de las cepas de *N. risticii* utilizan únicamente las secuencias del gen ARNr 16S, pero las diferencias en las secuencias de diferentes cepas de la misma especie de organismos rickettsiales son muy pequeñas (de 0 a 0,1%), lo cual puede hacer al análisis filogenético poco concluyente¹⁵, aunque otros autores refieren que aislamientos de *N. risticii* pueden diverger casi por 15 nucleótidos en su ARNr 16S⁴. En nuestro estudio encontramos pequeñas diferencias (hasta 5 nucleótidos) y se observó un agrupamiento relativo a regiones geográficas de la costa oeste de EEUU (Figura 1).

En este sentido, el análisis de genes adicionales (como el gen de choque térmico, *groESL*) permite reflejar una diversidad genética más extensa, permitiendo evidenciar mejor asociaciones geográficas entre cepas de *N. risticii*¹⁵. Sólo pudo amplificarse y secuenciarse una muestra mediante la PCR anidada para el gen *groESL*, esto podría deberse al mayor tamaño del fragmento que complejiza la amplificación siendo más sensible a la calidad del ADN. El análisis filogenético del fragmento *groESL* realizado en nuestro estudio revela también dos grupos de *N. risticii*: un grupo perteneciente a la costa oeste de EEUU (California y Oregon)

con hallazgos en caballos, caracoles acuáticos y trematodes, y el otro grupo con *N. risticii* halladas en el centro-este de EEUU (Michigan, Pennsylvania y Maryland) en caballos. *N. risticii* hallada en CABA se relaciona con uno de los grupos de la costa oeste de EEUU (Figura 2). El agrupamiento de los hallazgos de EEUU en el grupo de la costa oeste y del centro-este del país ya fue detectado en estudios previos utilizando otros fragmentos génicos⁸.

Dado el potencial impacto en medicina veterinaria, la caracterización molecular de *N. risticii* circulante en Sudamérica es de suma importancia dado que actualmente la información es muy limitada y no permite establecer conclusiones. Por otra parte, no hay registros de casos de ehrlichiosis monocítica equina en nuestro país, pero dada la circulación de este patógeno es necesario realizar estudios adicionales para comprender la ecología y transmisión de *N. risticii*, y detectar la aparición de casos en equinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baird, J.D.; Arroyo, L.G. Historical aspects of Potomac horse fever in Ontario (1924-2010). *Can Vet J.* 2013; 54:565-572.
2. Cicuttin, G.L.; Boeri E.J.; Beltrán F.J.; Gury Dohmen F.E. Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires, Argentina. *Pesq Vet Bras.* 2013; 33(5):648-650.
3. Coimbra, H.S.; Schuch, L.F.D.; Veitenheimer Mendes, I.L.; Meireles, M.C.A. *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no sul do brasil: *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocecous cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. *Arq Inst Biol.* 2005; 72(3):325-329.
4. Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51:2145-2165.
5. Durán, M.C.; Marqués, F.J. Detection of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in a Gypsy Vanner stallion from Manitoba. *Can Vet J.* 2016; 57:293-295.
6. Dutra, F.; Schuch, L.F.D.; Delucchi, E.; et al. Equine Monocytic Ehrlichiosis (Potomac Horse Fever) in Horses in Uruguay and Southern Brazil. *J Vet Diagnostic Investig.* 2001; 13(5):433-437.
7. Gibson, K.E.; Rikihisa, Y.; Zhang, C.; Martin, C. *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. *Environ Microbiol.* 2005; 7(2):203-212.
8. Gibson, K.E.; Pastenkos, G.; Moesta, S.; Rikihisa, Y. *Neorickettsia risticii* surface-exposed proteins: proteomics identification, recognition by naturally-infected horses, and strain variations. *Vet Res.* 2011; 42(1):71.
9. Greiman, S.E.; Tkach, V.V.; Vaughan, J.A. Transmission rates of the bacterial endosymbiont, *Neorickettsia risticii*, during the asexual reproduction phase of its digenean host, *Plagiorchis elegans*, within naturally infected lymnaeid snails. *Parasit Vectors.* 2013; 6(1):303.
10. Greiman, S.E.; Tkach, V.V.; Pulis, E.; Fayton, T.J.; Curran, S.S. (2014). Large scale screening of digeneans for *Neorickettsia* endosymbionts using real-time PCR reveals new *Neorickettsia* genotypes, host associations and geographic records including first reports from Australia and China. *Plos One.* 2014; 9:e98452.
11. Greiman, S.E.; Tkach, M.; Vaughan, J.A.; Tkach, V.V. Laboratory maintenance of the bacterial endosymbiont, *Neorickettsia* sp., through the life cycle of a digenean, *Plagiorchis elegans*. *Experimental Parasitology.* 2015; 157:78-83.
12. Greiman, S.E.; Vaughan, J.A.; Elmahy, R.; Adisakwattana, P.; Nguyen, H.V.; Fayton, T.J.; Khalil, A.I.; Tkach, V.V. Real-time PCR detection and phylogenetic relationships of *Neorickettsia* spp. in digeneans from Egypt, Philippines, Thailand, Vietnam and the United States. *Parasitology International.* 2017; 66:1003-1007.
13. Lin, M.; Zhang, C.; Gibson, K.; Rikihisa, Y. Analysis of complete genome sequence of *Neorickettsia risticii*:

- causative agent of Potomac horse fever. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(18):6076–6091.
14. Pusterla, N.; Johnson, E.M.; Chae, J.S.; Madigan, J.E. Digenetic trematodes, *Acanthatrium* sp. and *Lecithodendrium* sp., as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever. *J Helminthol.* 2003; 77(4):335–339.
15. Reubel, G.H.; Barlough, J.E.; Madigan, J.E. Production and Characterization of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, from Snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) in Aquarium Culture and Genetic Comparison to Equine Strains. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998; 36(6):1501–1511.
16. Vaughan, J.A.; Tkach, V.V.; Greiman, S.E. Neorickettsial endosymbionts of the digenea: diversity, transmission and distribution. En Rollinson, D.; Stothard, JR. (ed.). *Advances in parasitology.* Elsevier. London, UK, 2012:253–297.
17. Wilson, J.H.; Acvim, D.; Pusterla, N.; Bengfort, J.M.; Arney, L. Incrimination of Mayflies as a Vector of Potomac Horse Fever in an Outbreak in Minnesota. *AAEP Proc.* 2006; 52:324-328.

