

AAQ 2124

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA

“Aplicación del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*”.
Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química.

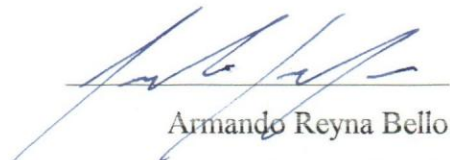
Autor: Vanessa Celma

Tutor: Armando Reyna Bello

Caracas, 22 de Julio de 2004

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado, titulado Aplicación del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* realizado por Vanessa del Pilar Celma Sparice para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 22 días del mes de Julio de 2004


Armando Reyna Bello
C.I.: 6.563.449

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	pp.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULOS	
I EL PROBLEMA	5
Planteamiento del Problema	5
Justificación de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
II MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	9
Antecedentes de la Investigación	9
Bases Teóricas	12
La Ehrlichiosis	12
Fase Aguda	14
Fase Subclínica	15
Fase Crónica	15
La Anaplasmosis	17
Reacción en Cadena de la Polimerasa	21
Paso 1: Denaturalización por calor	21
Paso 2: Hibridización	22
Paso 3: Extensión	22
Electroforesis en gel de Agarosa	22
Sistema de Variables	23
Variable Independiente	23
Variable Dependiente	23
Variables Intervinientes	23
Sistema de Hipótesis	23
Hipótesis de la Investigación	23
Hipótesis Nula	24
Hipótesis Alternativa	24
Definición de Términos Básicos	25
III EL MÉTODO	27
Extracción de ADN de Sangre Canina con Ehrlichia (Para 300 μ l de Sangre)	30
Técnica de PCR	30
Protocolo para la Técnica de PCR de Ehrlichia	31
Gel de Agarosa	31

Técnicas de Recolección de Datos	32
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
Estandarización del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplican el gen de la proteína 16S de <i>Rickettsias</i>	34
Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplican el gen de la proteína 16S de <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Anaplasma platys</i>	37
Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplican el gen de la proteína 16S de <i>Rickettsias</i> , en muestras provenientes de sangre humana	43
Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplican el gen de la proteína 16S de <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Anaplasma platys</i> , en muestras provenientes de sangre humana	44
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50

DEDICATORIA
A todas aquellas personas
que hicieron posible la
realización del presente
trabajo de investigación

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida necesaria para realizar el trabajo de investigación.

A mis padres por haberme traído al mundo y darme la posibilidad de una buena educación que me permita desenvolverse satisfactoriamente en mi vida presente y futura.

A mi Tutor por haberme dirigido no solo en el trabajo de investigación, sino por haber sido más que un Tutor, un Amigo.

A mis demás Familiares, Amigos y Compañeros que siempre estuvieron apoyándome hasta en los problemas más difíciles para salir adelante.

Gracias a Todos...

LISTA DE FIGURAS

		pp.
Figura 1	Frotis de capa blanca, de una muestra de sangre canina donde se muestra una mórura de <i>Ehrlichia canis</i> señalada por una flecha	16
Figura 2	Frotis de capa blanca de una muestra de sangre canina donde se observan mórulas de <i>Anaplasma platys</i> señalada por flechas	19
Figura 3	Micrografís electrónica, donde se muestra una mórula de <i>Anaplasma platys</i> señalada por la flecha	20
Figura 4	Agarosa (1 %) digitalizado donde se sembró los estándares de peso en el carril 1 y posteriormente dos caninos en diferentes concentraciones en los carriles CI, CII, CIII, CIV, CV, CVI, CVII y CVIII respectivamente	34
Figura 5	Gel de Agarosa (1 %) digitalizado donde se sembró los estándar de peso en el carril 1 y posteriormente los caninos C1, C2, C3, C4 y C5 en los carriles CI, CII, CIII, CIV y CV respectivamente. En el carril CVI se colocó el producto de PCR del ADN de <i>A. marginale</i> como control positivo.	35
Figura 6	Gel de Agarosa (1 %) digitalizado donde se sembró los estándares de peso en el carril 1 y posteriormente los caninos C12 (carril CI), C13 (carril CII), C14 (carril CIII), C15 (carril CIV), C16 (Carril CV) y C17 (carril CVI) y en el carril (C VII) el control positivo <i>A. marginal</i> . En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso	36
Figura 7	Gel de Agarosa (1 %) donde se muestra el resultado de la prueba de PCR de la muestra de sangre canina de C22 utilizando el cebador específico de <i>Rickettsia</i> . En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.	37

Figura 8	Gel de Agarosa (1 %) donde se muestra el resultado de la prueba de PCR del canino C4 (CII), utilizando el cebador específico de <i>Anaplasma platys</i> . En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.....	38
Figura 9	Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de los caninos C5 (CI) , utilizando el cebador específico de <i>Anaplasma platys</i> . En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.	39
Figura 10	Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR del canino C13 (CII), utilizando el cebador específico de <i>Anaplasma platys</i> . En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.	40
Figura 11	Gel de Agarosa donde se muestran los resultados de la prueba de PCR del canino C22 utilizando el cebador específico de <i>Ehrlichia canis</i> (carril C1) y <i>Anaplasma platys</i> (carril C2). En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.....	41
Figura 12	Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de cuatro muestras de sangre humana utilizando el cebador específico de <i>Rickettsia</i> . En el carril de la derecha se encuentran los estándares de peso.....	44
Figura 13	Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de dos muestras de sangre humana utilizando el cebador específico de <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Anaplasma platys</i> . En el carril CII el cebador específico a <i>Ehrlichia canis</i> para H3, CIV el cebador específico a <i>Anaplasma platys</i> para H3, CVI el cebador específico a <i>Ehrlichia canis</i> para H4 y CVII el cebador específico a <i>Ehrlichia canis</i> para H4. En el carril de la derecha se encuentran los estándares de peso	45

Figura 14 Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de una muestra de sangre humana utilizando el cebador específico de *Ehrlichia canis*. En el carril de la derecha se encuentran los estándares de peso 46

LISTA DE TABLAS

	pp.
1 Historial de los caninos estudiados	27
2 Historial de los humanos estudiados	29
3 Resumen de los resultados de la aplicación de la prueba de PCR para la detección de <i>Rickettsiosis sp.</i> , en caninos	42
4 Resumen de los resultados de la aplicación de la prueba de PCR para la detección de <i>Rickettsiosis sp.</i> , en humanos	47

**UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN, ESPECIALIDAD BIOLOGIA Y QUIMICA**

**APLICACIÓN DEL MÉTODO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE *EHRlichia CANIS* Y
ANAPLASMA PLATYS.**

Autor: Vanessa Celma
Tutor: Armando Reyna
Fecha: 22 de Julio de 2004

RESUMEN

Las Rickettsias son bacterias Gran negativas intracelulares obligatorias, que infectan a los mamíferos. Dentro de este Orden, encontramos *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, que infectan principalmente a los caninos en todo el mundo e incluso a los humanos. El vector principal de estas bacterias son las garrapatas denominadas *Rhipicephalus sanguineus*. En Venezuela, se diagnostica esta enfermedad principalmente por frotis de capa blanca, por esta razón, se estandarizó el método de PCR para la detección de estas bacterias, en el cual primeramente se identifica la presencia de *Rickettsia sp.*, con unos cebadores específicos y si es positiva la muestra se procede a determinar si es *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys* con otra PCR. La prueba se estandarizó para un volumen final 25 µl, conteniendo 2.5 mM de MgCl₂; 800 µM de dNTP's; 0.5 µM cebador directo y reverso; 1.25 unid Taq Polimerasa. y 5 µl de ADN; luego se utilizaron 3 ciclos en el termociclador: (1) a una Temperatura de 95° C por 5 min., con una repetición; (2) a una Temperatura de 95° C por 30 s., luego la temperatura desciende a 55° C por 30 s., y luego la temperatura vuelve a ascender a 72° C por 90s., estos tres pasos se repiten 45 veces; (3) a una Temperatura de 72° C por 5 min., y finalmente se mantiene a 4° C. Para la realización de ésta investigación se muestrearon 32 caninos sospechosos a Rickettsiosis, de los cuales solo seis resultaron ser positivos y de éstos 6 resultaron positivos a *E. canis*, 2 presentaron ambos parásitos y ninguno presentaba *A. platys* solamente. También se muestrearon 8 humanos, de los cuales 2 resultaron positivos a Rickettsiosis. Éstos resultados confirman que el método de PCR es una prueba sensible y específica para la identificación y diagnóstico de estas bacterias.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son el grupo de organismos más primitivo que existe, perteneciente al tipo celular denominadas procariota. Estas bacterias están constituidas por: una membrana celular, pared celular y en algunos casos presentan cilios y/o flagelos que le permiten la movilidad. Una característica importante de estos organismos es que el material genético constituido por ácido dexociribonucleico (ADN) no se encuentra encerrado dentro de una membrana nuclear, a diferencia de las otras células denominadas eucariotas que poseen un núcleo definido donde se encuentra el ADN (Prescott y col., 1999).

La pared celular de las células procariotas es una de las estructuras más importantes de la misma, ya que le confiere forma y las protege de la lisis osmótica. En el caso de microorganismos patógenos, la pared celular le puede conferir características que contribuyen a su patogenicidad, así como a su vez puede protegerla de sustancias tóxicas. Además de todo esto, en el estudio de la microbiología, la pared celular presenta ciertas propiedades que le permitieron a Chistian Gram (1884) clasificar a las bacterias en dos grandes grupos, gracias a la utilización de una tinción que lleva su mismo nombre (**Tinción de Gram**). Estos dos grandes grupos son: las bacterias grampositivas y las bacterias gramnegativas; la diferencia principal está en que la pared celular de las primeras carecen de un interpuente peptídico en las membranas denominado peptidoglucanos (Prescott y col., 1999) y de lipopolisacáridos.

Utilizando la clasificación de Gram y basado en características de desarrollo, cultivos, clínicas, etc., se han realizado históricamente clasificaciones de las bacterias, sin embargo recientemente Dumler y col. (2001) aplicando técnicas de biología molecular, sobre el gen 16S del ARNr han reacomodado taxonómicamente a las bacterias que pertenecen al grupo de las Rickettsias. Dentro de éste grupo de bacterias gramnegativas se ubican entre otros, las *Ehrlichias* y *Anaplasmas* que son

dos géneros de bacterias que infectan a los caninos principalmente, pero también pueden infectar ocasionalmente a los humanos.

El primer reporte de las ehrlichias se realizó en Argelia en el año 1935, siendo descritas como bacterias intracelulares (Preziosi y col., 2002). Dentro del grupo de las Ehrlichias encontramos a *E. canis*, *E. risticii*, *E. ewingii*, *E. equi*, *E. chaffeensis*, entre otras, aunque antiguamente eran seis, ya que se incluía a *Anaplasma platys* como otro tipo de *Ehrlichia*, pero para el año 2001, Dumler y col., realizaron una nueva clasificación, colocando a *E. platys* en el grupo de *Anaplasma*, porque se encontraron semejanzas filogenéticas con dicho género a raíz de las pruebas realizadas; y dentro del grupo de *Anaplasma* encontramos a *A. platys*, *A. granulocítica humana* y *A. marginal*, entre otros.

Luego de ser descubierta en Argelia, no es sino hasta la guerra de Vietnam en la década de los 70, cuando los veterinarios estadounidenses conocen la enfermedad. Luego en la mitad de la década de los 80, en Estados Unidos empiezan a aparecer casos de seres humanos infectados con una especie de *Ehrlichia*. Posteriormente fue reportada en perros en África, Europa, Asia, el Medio Oriente (Preziosi y col., 2002).

Estas bacterias necesitan de un agente de transmisión, es decir de un vector que le facilite la salida de un animal enfermo y la entrada al individuo que va a ser su hospedador para que pueda reproducirse. Para el caso de la rickettsiosis canina, el agente de transmisión son ectoparásitos conocidos comúnmente como garrapatas. En nuestro país estas bacterias son transmitidas por la garrapata marrón (*Rhipicephalus sanguineus*) que ataca a una gran variedad de animales incluyendo caninos y seres humanos (Preziosi y col.; 2002).

E. canis infecta células mononucleares fagocíticas de perros, ocasionando pancitopenia. Esta enfermedad presenta una fase de incubación de 1 – 3 semanas, la fase aguda dura de 2 – 4 semanas y produce pirexia, letargia, anorexia, pérdida de peso, disnea, cianosis, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hiperalbuminemia; y en su fase crónica produce depresión, hemorragia de las mucosas, epistaxis, retinitis,

edema corneal, anormalidades neurológicas, hiperproteinemia, hiperalbuminemia. *A. platys*, por su parte, infecta plaquetas, tiene una fase de incubación de 8 – 15 días, ocasiona una severa trombocitopenia cíclica, donde cada ciclo persiste durante 7 o 10 días, seguido por un corto período de mejoría, durante el cual el número de plaquetas regresa a su valor normal. Estos ciclos ocurren cada 10 o 14 días. La enfermedad es frecuentemente asintomática, pero los animales trombocitopénicos pueden tener graves hemorragias durante accidentes o cirugías, entre las alteraciones que presenta encontramos adenopatías, leucopenia, leucocitosis, hiperglobulinemia, hipocalcemia y trombocitopenia (Preziosi y col., 2002).

Para el diagnóstico de la enfermedad se han utilizado varios métodos tales como: Frotis de sangre de capa blanca, Inmunofluorescencia, Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), Inmunolectro Transferencia (Western Blot) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); en Venezuela se realiza el diagnóstico principalmente a través del frotis de sangre de capa blanca, pero se considera como una técnica subjetiva ya que requiere de mucha experiencia y es poco sensible e inespecífica (Arraga de Alvarado y col., 1999); sin embargo la prueba por PCR es una técnica sensible que permite la caracterización de microorganismos y no requiere de preparaciones complejas del antígeno como las otras pruebas serológicas (ELISA, inmunolectro transferencia, etc.).

En la presente investigación se pretende establecer el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como una técnica de diagnóstico precisa para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys* en caninos ya que actualmente en Venezuela no existe un método lo suficientemente sensible y específico para el diagnóstico de la enfermedad.

Finalmente este trabajo está constituido por un Capítulo I o El Problema donde está contemplado el planteamiento del problema, la justificación y los objetivos a alcanzar a lo largo de la investigación. Un Capítulo II o Marco Teórico en el cual se exponen los antecedentes tanto históricos como de la investigación, las bases teóricas que sustentan a la misma, el sistema de variables y de hipótesis.

Seguidamente se encuentra el Capítulo III o El Método, donde se describe el paradigma, tipo de investigación y diseño, el nivel de la investigación, modalidad, dimensión temporal, las fuentes, técnicas e instrumentos de recolección de información, técnicas de procesamiento de datos e información y procedimientos utilizados para el análisis de los datos. Y por último el marco administrativo, donde se exponen los recursos materiales, financieros, humanos y el cronograma a seguir durante el período de tiempo calculado.

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante mucho tiempo diferentes organismos han coexistido bajo diferentes formas, en el cual los organismos más primitivos, tienden a ser parásitos de otros seres vivientes; tanto es así que incluso hasta el llamado mejor amigo del hombre, la especie canina, es víctima de estos microorganismos, ejemplo de ellos son las *Ehrlichias* y *Anaplasmas*, que son transmitidos por artrópodos (garrapatas), de un animal enfermo a uno sano. No obstante, y sin menospreciar a estos compañeros inseparables del hombre, los perros pueden ser también un peligro para este, puesto que las garrapatas, provenientes de caninos infectados, pueden infectar a humanos y por ende éste puede adquirir la enfermedad (Arraga de Alvarado y col., 1999).

Hoy en día se ha visto un aumento en el número de casos de perros que presentan la infección con estas bacterias. En Venezuela donde de un total de 1135 hematologías realizadas solicitando 1085 diagnósticos de agentes hemotrópicos, 845 (70 %) casos fueron positivos a Ehrlichia bajo frotis en capa blanca, solo en caninos. Pero esto no solo llega aquí, sino que también se han observado casos de seres humanos que se le ha diagnosticado la enfermedad y utilizando la misma técnica de frotis, se diagnosticaron 2 casos de ehrlichia monocítica y más de 400 casos de rickettsia plaquetaria humana (Arraga de Alvarado y col., 1999).

Sin embargo debemos utilizar nuestros medios para controlar estas enfermedades que al ser zoonóticas en algunos casos ponen en peligro la salud de seres humanos, por lo que se hace necesario aumentar las investigaciones en este campo (Arraga de Alvarado y col., 1999).

En este sentido, el Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios en el Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT), desde Enero 2004 hasta Junio 2004, se realizó una investigación de carácter científico con la ayuda del

laboratorio clínico VetLab y El Centro Veterinario El Edén de las Mascotas, para la realización de la presente investigación.

Ante la situación problemática aquí planteada se formulan las siguientes interrogantes:

- **¿Será el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) una técnica precisa para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en caninos?**
- **¿Se podrá detectar rickettsias en las muestras de sangre canina aplicando el método de PCR?**
- **¿Puede el método de PCR diferenciar cuando la rickettsiosis es originada por *Ehrlichia canis*?**
- **¿Puede el método de PCR diferenciar cuando la rickettsiosis es originada por *Anaplasma platys*?**

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente en Venezuela, para determinar si un perro presenta o no ehrlichiosis, los veterinarios y laboratorios del país utilizan principalmente al Frotis en Sangre de capa blanca, que permite un diagnóstico rápido, no requiere de equipos sofisticados, pero tiene la desventaja que requiere un cierto nivel de entrenamiento, además de una constancia por parte del observador para poder buscar el o los organismo(s). Este método consiste en llenar un capilar con un poco de muestra sanguínea, y tapar el mismo con un poco de plastilina para que el líquido no se salga de dicho capilar; luego se centrifuga a 10000 xg durante 5 min., con la intención de separar los componentes sanguíneos en tres capas, en el cual la capa blanca queda en el medio (entre el suero y la capa de eritrocitos) y para retirarla se corta el capilar 1 mm aprox. por encima de la capa blanca y con la ayuda de una aguja se separa de las paredes del capilar la capa blanca y se empuja el tapón con la misma aguja por debajo para empujar la capa y se coloca en un porta objeto; luego, utilizando otro porta objeto, en un ángulo aproximado de 45° se extiende la capa blanca y posterior a esto

se procede a fijar la muestra con metanol y luego se tiñe con un colorante rojo (eosina) y otro azul (complejo azul – B), se lava con agua de chorro y se deja secar, por último se observa al microscopio de luz en el aumento 100X. Este tipo de prueba diagnóstica puede conllevar errores por la poca sensibilidad del método y además porque se pueden confundir los microorganismos con cambios celulares como macroplaquetas, plaquetas vacuolizadas, monocitos y linfocitos reactivos, fagocitosis de plaquetas y eritrocitos (Arraga de Alvarado, O. y col., s.f.). De allí la importancia de establecer una prueba de diagnóstico objetiva y eficiente de la enfermedad; ya que no se conocen suficientes datos epidemiológicos de la enfermedad en Venezuela. Por todo esto se utilizará el método de PCR, que aunque requiere de equipos especializados y costosos, permite la caracterización de microorganismos no cultivables y un diagnóstico sensible en etapas tempranas y en estadios crónicos de la infección.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General:

Aplicar el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como una técnica precisa para la detección de *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys*.

Objetivos Específicos:

- ✓ Determinar la presencia de *Rickettsia* en sangre canina aplicando el método de PCR.
- ✓ Determinar la presencia de *Rickettsia* en sangre humana aplicando el método de PCR.
- ✓ Identificar si la rickettsiosis es originada por *Ehrlichia canis* aplicando el método de PCR.

- ✓ Identificar si la rickettsiosis es originada por *Anaplasma platys* aplicando el método de PCR.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Dowson y col. (1996), trabajaron en el Sureste de Virginia con perros infectados naturalmente con el agente de la ehrlichiosis humana (*Ehrlichia chaffeensis*) y detectaron mediante la técnica de PCR la presencia de dichas bacterias en los caninos. En ésta investigación tomaron muestras de sangre a 74 caninos, en las cuales a 73 muestras se les realizaron pruebas serológicas por reacción de anticuerpos a *E. chaffeensis* y *E. canis*, y a 38 muestras se les realizó la prueba de PCR para detectar la presencia de *E. chaffeensis*, *E. canis*, y *E. ewingii*. También se realizaron pruebas con Nested – PCR donde se usó un modelo de primer de *Ehrlichia spp.*, para el producto inicial y luego se empleó los primer especie específicos para su detección. En la investigación obtuvieron un 34.4 % de perros presentaron anticuerpos reactivos contra *E. chaffeensis* y un 34.4 % de perros presentaron anticuerpos reactivos contra *E. canis*; y con respecto a la prueba de PCR obtuvieron un 42.1 % perros positivos a *E. chaffeensis*, un 31.6% perros positivos a *E. ewingii* y ningún perro positivo a *E. canis*. En éste trabajo se logró determinar que los perros son reservorios potenciales de *E. chaffeensis*.

Más tarde Breitschwerdt y col. (1998), realizaron una evaluación secuencial en perros infectados naturalmente con *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* o *Bartonella vinsonii*, en el cual trabajaron con 12 perros a los que se les realizaron pruebas serológicas usando inmunofluorescencia de anticuerpos (IFA), Western – blot, y análisis por nested – PCR; en el cual en éste último utilizaron los primers EHR – OUT1 y EHR – OUT2 para la amplificación del gen 16S perteneciente al género *Ehrlichia* y para las especies utilizaron los primer HE3-R, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* (Dowson, J.E. y col, 1996) y *E. equi* (Barlough, J.E. y col., 1996); para el caso de *Bartonella* utilizaron los primers

Bh16SF y Bh16SR (BH1), obteniendo como resultado que según la prueba de PCR los caninos muestreados, tan solo siete resultaron positivos, y en algunos casos existía una coinfección con tres especies de *Ehrlichia*.

Para el mismo año Parola y col. (1998), trabajaron en la amplificación del ADN ehrlichial en la garrapata *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) en Francia, en el cual amplificaron por PCR el gen 16S de ADN la proteína ribosomal del agente de ehrlichiosis granulocítica humana (HGE) y *Ehrlichia phagocytophilak* con la finalidad de comparar el grado de similitud que presentaban ambas especies de *Ehrlichia*. Los resultados obtenidos arrojaron que ambas especies, y conjuntamente con *E. equi*, tenían un 99.4 % de similaridad; demostrando también que los niveles de variación son los responsables de la infección en animales y humanos.

Dos años después Parola y col. (2000), realizaron una investigación para la detección de *Ehrlichia* en África a través de la prueba de PCR, donde utilizaron los cebadores EHR16SD y EHR16SR para poder amplificar el ADN de diferentes organismos del phyla Protobacteria, entre ellos *Ehrlichia spp.*, proveniente de garrapatas infectadas, en la cual, lograron amplificar el gen 16S ARNr perteneciente a *E. sennetsu*, *E. phagocytophila*, *E. chaffeensis*, *E. risticii*, *E. canis*, *Neorickettsia helminthoeca*, *Cowdria ruminantium*, el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana, *A. marginal*, entre otros, el cual el fragmento era de 345 pb; pero otros organismos pertenecientes al phyla no fueron amplificados por PCR tal como *Rickettsia risticii*, *Bartonella elizabethae*, *Brucilla melitensis*, *Escherichia coli*, entre otros; lo que indica que los primers antes mencionados son específicos para las especies de *Ehrlichia* y entre otros microorganismos taxonómicamente cercanos, tales como *Anaplasma sp.*

En el mismo año Inokuma y col. (2000), detectaron el ADN de *Ehrlichia platys* en garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en la isla de Okinawa en Japón. Utilizaron 32 garrapatas recolectadas de 8 caninos, en el cual a través de la prueba de PCR se identificaron si éstas presentaban dichas bacterias utilizando los primers género específicos EHR16SD y EHR16SR, descritos por Parola y col. (1996) y para

la detección de la especie se sustituyó el primer EHR16SD por el especie específico PLATYS, obteniendo que los fragmentos de *E. platys* estaban entre 678 o 679 pb, y que de los ocho perros analizados, tan solo cuatro fueron detectados como positivos ante la prueba de PCR.

Hancock y col. (2001) en un trabajo amplificando por PCR la secuencia del gen 16S ribosomal lograron diferenciar sangre de caninos infectados con *E. platys* de *E. equi*. La investigación antes mencionada se relaciona con la presente en que utilizan la prueba de PCR como método de diferenciación entre dos agentes ehrlichiales diferentes.

Por otra parte, Suksawat y col. (2001) realizaron un trabajo de coinfección de tres especies de *Ehrlichia* en perros de Tailandia y Venezuela, también con la secuencia de ADN 16S ribosomal, en donde trabajan con dos perros que presentan una infección múltiple, en el cual luego de realizar estudios utilizando el método de PCR detectaron que los perros presentaban tres tipos de especies de *Ehrlichia*, las cuales eran: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys* (actualmente *A. platys*) y *Ehrlichia equi*. También en éste estudio se muestra parte de la secuencia correspondiente al gen de la proteína 16S del ribosoma de *A. platys*.

En este mismo sentido Unver y col. (2001) examinaron perros y garrapatas que estaban infectados con *E. canis* en Venezuela y, establecieron la correlación para determinar si éste es el mismo tipo que el aislado humano. Para ello, utilizaron el método de PCR con cebadores específicos para *E. canis* y revelaron, que 17 muestras de sangre proveniente de perro de los 55 casos estudiados eran positivos a la bacteria, incluso algunas garrapatas de éstos perros también estaban infectadas. Luego fueron aisladas las Ehrlichias y propagadas en un canino. Luego estas bacterias fueron analizadas más a fondo para determinar sus características moleculares y antigénicas. Posteriormente de realizar esto, se observó que el aislado nuevo VDE era idéntico al aislado humano venezolano denominado Ehrlichia (VHE) y fue relacionada con las *E. canis* de Oklahoma.

Arraga-Alvarado y col. (2003) trabajando con 3 perros inoculados con *E. platys* y 2 infectados naturalmente, encontrando que con la técnica de coloración de frotis llamada Dip Quick, se observó un 60 a 97 % de rickettsemia en los perros inoculados. Al ver las plaquetas por microscopía electrónica se notaban las mórulas en su interior, de forma pleomórfica distinguiéndose la doble membrana característica de las bacterias gramnegativas. Dentro de las mórulas de las plaquetas se encontraron un número de organismos que iban de 1 a 15. Los perros que se infectaron naturalmente mostraron diferencias en sus características ultraestructurales donde algunos organismos contenían un material central denso irrigado moderadamente. Otros resultados de esta investigación indicaron que las diferentes características en la ultraestructura del organismo se debe a las distintas etapas del desarrollo por las que pasa *A. platys*.

Massung y col. (2003) utilizaron la prueba de PCR como un método para diagnosticar los diferentes casos de ehrlichiosis en humanos tanto en Estados Unidos como en Europa, y no solo eso, sino que también probaron con diferentes cebadores que amplifican parcialmente el gen correspondiente a la proteína 16S del ribosoma, de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana que actualmente se conoce como *Anaplasma phagocytophilum*. Los resultados obtenidos fueron la fabricación de tres estuches comerciales de PCR como prueba de detección, especificidad y no especificidad de una amplia gama. Estos resultados permiten el diagnóstico molecular de la ehrlichiosis en los humanos.

BASES TEÓRICAS

La Ehrlichiosis:

La Ehrlichiosis es una enfermedad producida por *Ehrlichia*, bacterias gramnegativas obligatorias intracelulares, que utilizan un artrópodo para su transmisión (Preziosi, D. y col., 2002). Actualmente, según Dumler, S. y col. (2001) pertenecen a la familia Anaplasmataceae, Orden Rickettsias.

E. canis, *E. ewingii*, y otros organismos que también atacan a los caninos como *Babesia canis* y *Babesia gibsoni* (Preziosi, D. y col., 2002).

La transmisión y la patogenicidad de la ehrlichiosis en caninos descrita por Preziosi, D. y col. (2002), indica que de *E. canis*, se aplica para el resto de las especies. Ésta *Ehrlichia* logra entrar en un perro sano a partir de la picada de una garrapata infectada que introduce la bacteria a través de su probocida. A su vez, las garrapatas en estado de larva o ninfa adquieren el organismo, cuando se alimentan de la sangre de un canino que está infectado. Luego la garrapata cae para realizar su muda de larva a ninfa o de ninfa a adulta y al montarse en otro hospedador, la bacteria es propagada.

Ésta enfermedad está descrita en tres etapas (Fase Aguda, Fase Subclínica y Fase Crónica), presentando sintomatologías particulares:

Fase Aguda:

Ocurre entre 1 a 3 semanas después que la garrapata infectada se alimenta en un animal sano, luego la bacteria invade leucocitos y se divide formando mórulas (colonias encerradas por una membrana vacuolar) (Figura 1). Normalmente las especies de *Ehrlichia* tienden a infectar células mononucleadas o leucocitos granulocíticos; por ejemplo, para el caso de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. risticii* (*Neorickettsia risticii*), invaden células mononucleadas, mientras que *E. ewingii*, *E. phagocytophila* y *E. equi* invaden neutrófilos granulocíticos o eosinófilos. La sintomatología clínica que presentan los individuos infectados con *E. canis* son: pancitopenia, trombocitopenia, pirexia, letargia, anorexia, pérdida de peso, disnea, cianosis, hiperglobulinemia e hiperalbuminemia.

Ahora bien, cuando los animales han sido diagnosticados en la etapa aguda de la infección, estos suelen presentar letargia, fiebre, anorexia, pérdida de peso, esplenomegalia, y limfadenopatía generalizada. Los casos más comunes de perros infectados con *Ehrlichia canis* están relacionados a la fase aguda, observándose tan solo síntomas tales como letargia, anorexia y pérdida de peso; sin embargo entre el 25 al 60 % de los casos presentan tendencias de sangrado, epistaxis, melena, petequia

y/o hemorragias equinoxicas, flema, hemorragia retinal y hematuria. Dentro de las manifestaciones neurológicas de la infección encontramos: ataxia, paraparesis, pérdida de conciencia, ladeo de cabeza, nistagmus y ataques. Otro signo común de la fase crónica incluye glomerulonefritis con síndrome nefrótico o pancitopenia resultando en una infección secundaria y anemia severa.

Fase Subclínica:

Esta fase se caracteriza por la presencia persistente de los organismos en el hospedador y ausencia de la enfermedad clínica, donde probablemente el agente infeccioso es retenido en un número bajo en células mononucleadas hepáticas. Su duración puede variar desde semanas hasta años. A pesar de que los perros son asintomáticos en su clínica, sin embargo en las pruebas hematológicas los perros tienden a presentar anormalidades como hiperglobulinemia, trombocitopenia.

Fase Crónica:

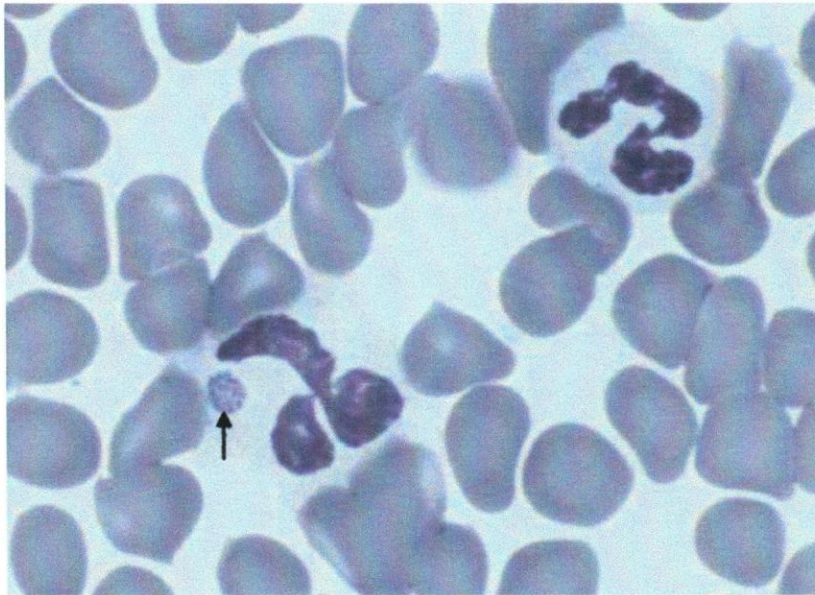
En esta fase la sintomatología clínica se caracteriza por presentar depresión, hemorragia de las mucosas, epistaxis, retinitis, edema corneal, anormalidades neurológicas, hiperproteinemia e hiperalbuminemia.

Preziosi, D. y col. (2002), explica que la infección asociada a *Ehrlichia canis* está relacionada con el estado inmune del organismo huésped y con la raza del animal. Es común observar que en el estado agudo de la infección pase desapercibida o presenta una leve señal, a tal punto que los dueños del animal no buscan la ayuda veterinaria para estas mascotas. Ya en la fase subclínica es clásico no ver síntomas clínicos, aunque existan anormalidades en la hematología.

En ésta fase no es usual encontrar valores normales de plaquetas, pero los casos que presentan trombositopenia son aún más comunes. También encontramos que los animales que presentan esta etapa de la infección poseen anemia no regenerativa que a menudo es moderada o suave, en cuanto a las células sanguíneas blancas pueden encontrarse, durante la infección, dentro de los rangos normales o por encima de los mismos.

Figura 1

**Frotis de capa blanca, de una muestra de sangre canina donde se muestra una
mórula de *Ehrlichia canis* señalada por la flecha
(Foto gentilmente donada por O. PARRA)**



Por otra parte, Preziosi, D. y col. (2002) menciona que *E. ewingii* es uno de los dos agentes ehrlichiales que puede ocasionar la infección granulocítica en los caninos, siendo el otro agente causante de la enfermedad *E. equi*. Entre estos dos agentes, no hay mucha diferencia para su identificación en las mórulas granulocíticas. Un síntoma clásico que presentan los animales con esta infección es la poliartritis aguda. La cojera puede aparecer solo en una extremidad o progresivamente miembro a miembro. Pueden presentar a menudo sintomatología febril, tendencia a sangrado y en muchas infecciones se observa una trombositopenia suave a moderada. También existen reportes de animales con esplenomegalia, hepatomegalia, meningitis, infecciones dobles con *E. canis* y *E. ewingii* en asociación con ataxia profunda y epistaxia. La infección con *E. ewingii* provoca, en pocos casos, la muerte del animal.

Al igual que con la infección de *E. ewingii*, la incidencia de la infección con *E. equi* es desconocida, pero se puede encontrar en grandes proporciones al noroeste de Estados Unidos y al norte del medio oriente del mencionado país y en California donde las infecciones en equinos son de manera endémica. Los síntomas clínicos que presentan los animales infectados con este agente ehrlichial incluye fiebre, letargia y trombositopenia; aunque no son signos clínicos específicos para *E. equi* tampoco es muy frecuente encontrar animales que presenten poliartritis, signo que si es común encontrar en *E. ewingii*.

Otro agente ehrlichial que describe Preziosi, D. y col. (2002) es *Ehrlichia chaffeensis*, que en un primer lugar se describe como un patógeno humano, sin embargo los perros también son susceptibles a tener infecciones con este organismo. Los síntomas que presentan los caninos infectados son: vómitos, epistaxis, linfadenopatía y uveítis anterior; y en el caso de los seres humanos los síntomas característicos de la HGE son: fiebre, dolor de cabeza y meningitis y puede ser causa de muerte en humanos.

La Anaplasmosis:

Por otra parte encontramos al grupo *Anaplasma*, productora de la enfermedad Anaplasmosis. Éstos organismos también pertenecen a la familia

Anaplasmataceae (Dumler, S. y col., 2001) quienes se les considera como organismos Gram – negativos, pequeños, a menudo pleomórficos, formando cocos que residen dentro de las vacuolas citoplasmáticas, presentan un tamaño que está entre 0.2 a 0.4 μm de diámetro y una coloración violeta cuando se les tiñe (Figura 2). Se encuentran formando mórulas a menudo en células hematopoyéticas maduras o no, en particular células mieloides y neutrófilas e inclusive los eritrocitos, en sangre periférica o en los tejidos finos que cumplen función fagocitaria como el bazo, el hígado y la médula, en hospedadores mamíferos. La multiplicación de éstos organismos se realiza por fisión binaria, no presentan ácidos grasos y también es característico que no son cultivables (Ristic, M. y col., 1984).

Al igual que sucede con las *Ehrlichias*, la infección con *Anaplasma* también tiene fases clínicas y no clínicas de la enfermedad, es decir, donde se observan síntomas que demuestran que el animal está infectado o no. Para la anaplasmosis canina el primer síntoma de la infección viene dado por la presencia de anemia (Ristic, M. y col., 1984).

Los organismos de la especie *Anaplasma marginal* que se encuentran dentro de los eritrocitos presentan un tamaño aproximado entre 0.3 a 1.0 μm de diámetro y forman una vacuola donde se dividen por fisión binaria. Estas bacterias afectan principalmente rumiantes y se valen de un artrópodo que le sirva como vector. Estudios utilizando el microscopio electrónico revelan que dichos organismos forman un material granulado electro denso y presentan una doble membrana que lo recubre (Ristic, M. y col., 1984).

Como agente causante de la Anaplasmosis en caninos encontramos a *Anaplasma platys* (antes *Ehrlichia platys*). Los vectores más conocidos para la transmisión de estos organismos son las garrapatas. Estas bacterias crecen en las garrapatas permaneciendo allí por largos períodos de tiempo (Dumler, S. y col., 2001). Su nombre proviene de la célula a la que infecta, las plaquetas (Figura 2 y 3). Se observan casos donde existe una coinfección con *E. canis*. La infección con éste organismo puede provocar ciclos de trombositopenia y los síntomas clásicos de las

Figura 2

**Frotis de capa blanca de una muestra de sangre canina donde se observan
mórulas de *Anaplasma platys* señalada por las flechas.**

(Foto gentilmente donada por O. PARRA)

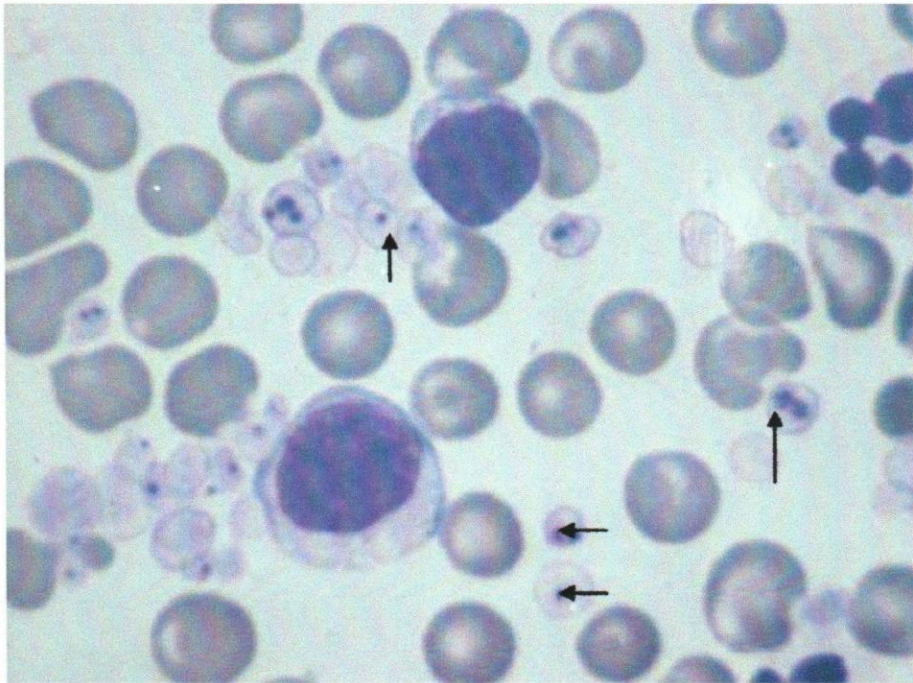
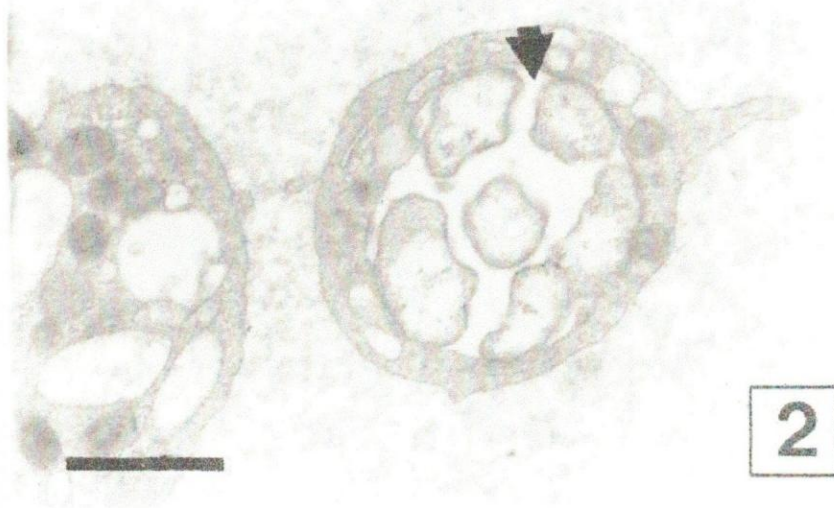


Figura 3

Micrografía electrónica, donde se muestra una mórula de *Anaplasma platys* señalada por la flecha (Foto gentilmente donada por O. PARRA)



infecciones con *Anaplasma platys* son similares a los nombrados anteriormente (Dumler, S. y col., 2001) para las *Ehrlichias*.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

En la ciencia actual se han realizado descubrimientos que transforman verdaderamente el modo en que se trabaja y piensa. Aunque el progreso quizás ha sido lento, en el caso de la biología molecular esto no ha sido así, ya que afortunadamente se han logrado grandes cambios en un tiempo ciertamente corto. Uno de estos cambios se dio a mediados de los años 70, con la identificación de enzimas de restricción, el desarrollo de vectores de clonación, entre otros; y un segundo salto tecnológico ocurrió en 1985, con la introducción de una técnica que tiene una mayor aplicación en el laboratorio clínico: la reacción de polimerasa en cadena, más conocida por sus siglas en inglés PCR (Polymerase Chain Reaction).

La Técnica de PCR se define como una forma simple y especialmente rápida de multiplicar ADN presente en diferentes muestras biológicas para facilitar su identificación. Este método fue desarrollado por el químico Kary B. Mullis.

Para 1985, la técnica fue revelada y tuvo gran aceptación por la comunidad científica. Para 1991 el uso de la técnica de PCR fue extendido y referenciado en miles de artículos científicos.

La técnica de PCR es un proceso que consta de tres etapas que forman un ciclo, el que se repite un número determinado de veces: Denaturalización, Hibridización y Extensión. El proceso se lleva a cabo en un termociclador (instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos), estos ciclos son:

Paso 1: *Denaturalización por calor.* (Temp. mayor o igual 90 ° C), separa la doble hebra de ADN en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos.

Paso 2: Hibridización (Alineación). Los cebadores (primers) son secuencias sintéticas cortas de ADN de una sola hebra que poseen de 20-30 bases. Son específicos y delimitan la región blanco del genoma del organismo de interés. Se incluyen dos cebadores en la reacción de la PCR, cada uno complementario de una de las hebras de ADN que se separaron durante la desnaturalización. Generalmente, este proceso se lleva a cabo entre 40 ° C y 65 ° C, dependiendo de la longitud y de la secuencia de bases de los primers. Esto permite la unión específica de los cebadores a su hebra complementaria.

Paso 3: Extensión. Una vez que los cebadores se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72 ° C y la enzima *Taq* ADN polimerasa se usa para replicar las hebras de ADN. La *Taq* polimerasa comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de ADN.

(<http://www.roche.cl/diagnostics/tecnologia.htm>).

Este ciclo de tres pasos (desnaturalización, hibridización y extensión) puede ahora repetirse muchas veces. Conforme la técnica de PCR continúa, se crean primero dos, cuatro, ocho,... 2ⁿ copias (n= número de ciclos), obteniéndose después de 30 ciclos 1.073.741.824 copias. Este proceso de PCR también es llamado amplificación debido a que la secuencia objetivo es copiada una y otra vez con el objeto de hacer millones de copias. Esto permite tener suficiente material genético para detectar la presencia y la cantidad del patógeno.

(<http://www.roche.cl/diagnostics/tecnologia.htm>).

Electroforesis en gel de Agarosa:

La electroforesis en gel de agarosa es un método sencillo, usado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN a través del paso de una corriente eléctrica sobre un gel, que para este caso proviene de la agarosa, que es un compuesto lineal que se obtiene de un alga marina.

Ahora bien, el principio por el cual se rige el proceso de electroforesis, es básicamente el separar fragmentos de ADN por su peso molecular, el tamaño del poro

formado en el gel (permite la separación por tamaño, mientras más grande sea el poro con mayor facilidad va a migrar el fragmento de ADN). Luego el ADN es teñido con bromuro de etidio que tiene afinidad por los nucleótidos y emite luz cuando es excitado por luz ultravioleta, lo que permite visualizar los fragmentos de ADN presentes en el gel de agarosa (Sambrook y col., 1989).

SISTEMA DE VARIABLES

Variable Independiente:

La Variable Independiente que atiende a la presente investigación son los resultados obtenidos con el método de PCR.

Variable Dependiente:

La Variable Dependiente que atiende a la presente investigación está relacionada con la Casuística, es decir, con la presencia o no de un tipo específico de bacteria, bien sea *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys*.

Variables Intervinientes:

Entre las Variables Intervinientes se encuentra la toma de la muestra: (1) en presencia de EDTA, (2) período entre la toma de la muestra y la extracción del ADN, (3) Purificación del ADN y (4) metodología: (Ciclo 1) Desnaturalización a 95° C por cinco (5) minutos con una (1) sola repetición, (Ciclo 2) Desnaturalización 95° C por treinta (30) segundos, Hibridización a 55° C por treinta segundos y Extensión por 72° C por noventa segundos son cuarenta y cinco (45) repeticiones, (Ciclo 3) Extensión a 72° C por cinco (5) minutos y (Mantenimiento) a 4° C.

SISTEMA DE HIPÓTESIS

Como posibles respuestas a las interrogantes ya planteadas en el capítulo anterior se nos presentan las siguientes hipótesis:

- *Hipótesis de la Investigación:* El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de diagnóstico efectiva para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*.

• *Hipótesis Nula:* El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) no es una técnica de diagnóstico efectiva para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*.

• *Hipótesis alternativa:* El Frotis de Sangre de Capa Blanca y la Sintomatología Clínica son métodos eficientes para el diagnóstico de la Ehrlichiosis.

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Las siguientes definiciones fueron tomadas del Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas (Salvat Editores,)

Ataxia: Trastorno del movimiento voluntario, que aparece incordiando, estando conservada la fuerza muscular. La alteración de cualquiera de los mecanismos que intervienen en la realización del movimiento voluntario dificultando su normal ejecución, determinará la ataxia. La lesión de las raíces posteriores de la médula o de los cordones posteriores medulares determinará una alteración de la sensibilidad profunda conciente (palestesia o vibratoria, artrocinética oposicional, grafostesia), que al no informar a los centros nerviosos de la posición de cada uno de los segmentos del cuerpo, dificultará la ejecución del movimiento. La alteración de los haces espinocerebelosos medulares que transmiten la sensibilidad profunda inconsciente y la lesión del cerebelo, determinan una alteración de la coordinación del movimiento, con falta de medida de éste en el espacio y en el tiempo (discronometrís), o con descomposición del movimiento (temblor atáxico).

Cianosis: Coloración azul de la piel y mucosas, especialmente la debida a las anomalías cardíacas causa de la oxigenación insuficiente de la sangre.

Disnea: Dificultad en la respiración.

Edema: Acumulación excesiva de líquido sero albuminoso en el tejido celular debida a diversas causas: disminución de la presión osmótica del plasma por reducción de las proteínas; aumento de la presión hidrostática en los capilares por insuficiencia cardíaca; mayor permeabilidad de las paredes capilares u obstrucción de las vías linfáticas. La hinchazón producida se caracteriza por conservar la huella de la presión del dedo.

Epistaxis: Hemorragia por las fosas nasales.

Esplenomegalia: Aumento de volumen o hipertrofia del bazo.

Hematuria: Emisión por la uretra de sangre pura o mezclada con la orina; síntoma de enfermedades diversas.

Hemorragia Equinoxica: Pequeña hemorragia de forma irregular y de bordes definidos que se presenta en las mucosas y cerosas de los diferentes órganos (A. REYNA, comunicación presencial).

Hepatomegalia: Aumento de volumen del hígado. Hepatomacrosia, megalohapatía.

Hiperalbuminemia: Exceso de materias albuminoideas en la sangre u otros líquidos.

Hiperglobulinemia: Exceso de hematíes en la sangre, policitemia, eritrocitosis o hipereritrocitemia.

Hiperproteinemia: Aumento de las proteínas en sangre.

Letargia: Estado patológico de sueño profundo y prolongado.

Linfadenopatía: Término común para las afecciones de los ganglios o del tejido linfático.

Melena: Expulsión de sangre alterada por el ano, sola o con eses, consecutiva, generalmente, a una enteroragia o gastroragia.

Nistagmus: Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos: horizontales, verticales, oscilatorios, rotatorios o mixto.

Pancitopenia: Escasez de todos los elementos celulares de la sangre; Anemia aplásica.

Paraparesis: Paraparesia, Paresia, especialmente de los miembros inferiores; paraplejia ligera.

Petequia: Pequeña mancha en la piel formada por la efusión de sangre, que no desaparece por la presión del dedo.

Pirexia: Fiebre, Estado febril.

Retinitis: Inflamación, aguda o crónica de la retina.

Trombocitopenia: Disminución del número de plaquetas de la sangre; Trombopenia.

Uveítis: Inflamación de la úvea (cara posterior pigmentada del iris).

CAPÍTULO III EL MÉTODO

La presente investigación se enmarca dentro del paradigma positivista, según su alcance temporal será longitudinal, un nivel de profundidad explicativo y según el ambiente donde se desarrolla será de laboratorio, según su enfoque será cuantitativo y según la modalidad del trabajo la investigación será de campo. El diseño de la investigación será Experimental puro, ya que se utilizarán grupos experimentales y de control, donde se manipularán las variables independientes y se controlan las intervinientes y se utilizará un procedimiento sesgado para la selección y asignación de los sujetos a estudiar (Hernández Sampieri, R. y col., 2001)

Muestreo: N número de animales fueron utilizados para el presente trabajo, también se emplearon seis muestras humanas. Las muestras sanguíneas fueron tomadas a partir de la vena humoral con tubos al vacío (tipo Vacunntainer) en presencia de EDTA. A continuación se presentan dos tablas, una con los animales estudiados y otro con los humanos analizados a lo largo de la investigación.

Tabla 1
Historial de los caninos estudiados

Nombre	Nº	Veterinario	Clínica Veterinaria	Fecha de Recolección	Diagnóstico	Prueba de Diagnóstico
Duque	C1	Andrés Solorzano	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	13/05/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Wisky	C2	Anónimo	Cen. Vet. El Hatillo 2 C.A.	31/03/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
El Pla...	C3	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró
Macuto	C4	Anónimo	Cen. Vet. El Hatillo 2 C.A.	Abr./2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Sharon	C5	Anibal Hurtado	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	24/03/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Cindy	C6	Anibal Hurtado	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	20/03/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Danp	C7	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró

Nombre	Nº	Veterinario	Clínica Veterinaria	Fecha de Recolección	Diagnóstico	Prueba de Diagnóstico
Beyly	C8	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró
Quini	C9	Andrés Solorzano	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	05/05/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Emma	C10	Anónimo	Cen. Vet. El Hatillo 2 C.A.	05/05/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Toby	C11	Adam Etayo	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	19/05/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Candy	C12	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró
León	C13	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	22/07/2003	No se encontró	No se encontró
Peri	C14	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró	No se encontró
Catire	C15	Anónimo	Campo Claro	22/07/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Ponky	C16	Anónimo	Veterinaria El Placer	01/08/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Orietta	C17	Anónimo	Grupo Veterinario Egoavil Sardivas	09/05/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Dany	C18	Milagros Lira	Cen. Vet. El Hatillo 2 C.A.	117/09/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Carola	C19	Andrés Solorzano	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	16/09/2003	Sospechoso a <i>Ehrlichia</i>	Frotis
Rocky	C20	Alfonso Rivas	Consultorio Veterinario La Avileña	19/05/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Sassy	C21	Ahimaru Quintero	Centro de Atención a las Mascotas	19/09/2003	Positivo a <i>Ehrlichia platys</i>	Frotis
Rodax	C22	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	07/02/2004	Positivo a <i>Ehrlichia canis*</i>	Frotis
Gorda	C23	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica

Nombre	Nº	Veterinario	Clínica Veterinaria	Fecha de Recolección	Diagnóstico	Prueba de Diagnóstico
Yani	C24	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Donglita	C25	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Boby	C26	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Guicho	C27	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Gragy	C28	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Ady	C29	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Hule	C30	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica
Canela	C31	Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Sintomatología Clínica

* Diagnóstico accidental

Tabla 2
Historial de los humanos estudiados

Nombre	Nº	Médico	Clínica	Fecha de Recolección	Diagnóstico	Prueba de Diagnóstico
Francisco	H1	Dr. Antonio	Metropolitana	-	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Frotis
Wanda	H2	Dr. Antonio	Metropolitana	28/08/2003	Positivo a <i>Ehrlichia sp.</i>	Frotis
José Gregorio	H3	Dra. Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Contacto con caninos
Alex	H4	Dra. Mirna Calderón	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Contacto con caninos
Zulia	H5	Dra. Zulay	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	12/05/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Contacto con caninos
Adrian	H6	Dr. Adrian	Cen. Vet. El Edén de Las Mascotas	05/06/2004	Sospechoso a <i>Rickettsia sp.</i>	Contacto con caninos

Extracción de ADN de Sangre Canina (Para 300 µl de Sangre)

En un tubo de 1,5 ml se añadieron 900 µl de Solución de Lisis de Células y 300 µl de sangre y se mezclaron de 5 – 6 veces por inversión, se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron a 16000 xg por 20 min. Luego se descarto el sobrenadante utilizando una micropipeta y se agito con un vortex el tubo, hasta que las células blancas se resuspendieron. Posteriormente se añadieron 300 µl de Solución de Lisis de Núcleo al tubo, se pipetio de 5 – 6 veces para lisar las células blancas (si se formaron agregados de células después de mezclar, se incubó la solución a 37° C hasta que se rompieron). Luego se añadieron 1,5 µl de Rnasa y se mezclaron de 2 – 5 veces, luego se incubaron a 37° C por 15 min. y después a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de Solución de Precipitación de Proteínas y se agitaron con el vortex durante 10 – 20 s. Después se centrifugaron nuevamente a 16000 xg por 3 min. a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml que contuviese 300 µl de isopropanol. Luego se mezclaron hasta observar los hilos de ADN, se centrifugaron a 16000 xg por 5 min. a temperatura ambiente, se descarto el sobrenadante, se añadieron 300 µl de etanol 70 % a temperatura ambiente y se invirtió el tubo varias veces con el fin de lavar el depósito de ADN y los lados del tubo. Luego se centrifugó a 16000 xg por 1 min. a temperatura ambiente, se aspiró el etanol cuidadosamente con una micropipeta, se invirtió el tubo sobre un papel absorbente para secar, durante 10 – 15 min. Después se añadió 100 µl de Solución de Rehidratación de ADN y se incubó a 65° C durante 1 hora o a 4° C durante toda la noche. Finalmente se almacenó el ADN a una temperatura de 2 – 8° C.

Técnica de PCR

Se preparó la solución de PCR colocando 2.5 µl de Buffer de MgCl₂ (1x), 2.5 µl de MgCl₂ (2.5 mM), 0.5 µl dNTP's (800 µM), 1.25 µl del primer EHR16SD (5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3') (0.5 µM), 1.25 µl del primer EHR16SR (5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3') (0.5 µM), y en el caso que se fuese a hacer

la amplificación especie específico, se sustituye el primer primer por el primer *E. canis* (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3') o por el primer PLATYS (5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3'), en la misma cantidad y concentración, 0.25 µl de Taq polimerasa (1.25 unid/25 µl), 11.75 µl de H₂O y 5 µl de ADN, dando un total de 25 µl de solución. Luego se colocaron los tubos en el Termociclador (BioRad icycler) el cual ha sido previamente programado según el cuadro siguiente:

Protocolo para la Técnica de PCR de Ehrlichia:

Paso	Temperatura (° C)	Tiempo	Repeticiones	Ciclo
Denaturalización	95	5 min.	1 vez	1
Denaturalización	95	30 s.	45 veces	2
Hribridización	55	30 s.		
Extensión	72	90 s.		
Extensión	72	5 min.	1 vez	3
Mantenimiento	4	∞		

Gel de Agarosa

Se preparó la solución de agarosa (0.25 gr. de agarosa con 25 ml de TAE. Una vez hecha la solución, se colocó 1,25 µl de Bromuro de Etidio y se vertió la misma en un molde; previamente nivelado y colocado el peine. Luego de esperar entre 15 – 30 min. a que se gelifique la solución, se retiró el peine con mucho cuidado y el gel y el molde y se introdujeron en la cámara de corrida. Posteriormente, se mezclaron 2 µl de tampón muestra con 18 µl del producto de PCR, se colocaron las muestras en los bolsillos y se corrieron las muestras a 80 voltios por 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el gel de la cámara de corrida y se visualizó en el analizador de imágenes.

TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

En cuanto a las técnicas que se utilizaron para el procesamiento de los datos, encontramos las siguientes:

1. Registro
2. Clasificación
3. Tabulación

Para el análisis de los resultados que se obtuvieron en la presente investigación se tomarán en cuenta los siguientes:

1. Técnicas Lógicas:
 - 1.1. Uso de la inducción
 - 1.2. Análisis
2. Técnicas Estadísticas:
 - 2.1. Descriptiva
 - 2.2. Inferencial

En cuanto a la identificación de las bacterias, se realizó utilizando los pesos moleculares de los fragmentos especie – específicos de *Rickettsia sp.* (345 pb.), *Ehrlichia canis* (1100 pb.) y *Anaplasma platys* (678 pb.), mostrados en el gel de agarosa con la ayuda de un standard de peso molecular.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos a lo largo del período experimental, a fin de cumplir con los objetivos planteados. Los resultados serán expuestos en forma de figuras, donde se observan los geles de agarosa digitalizados que fueron utilizados para sembrar los productos de PCR, de los diferentes animales que se analizaron durante el período experimental.

En total se analizaron 31 caninos que fueron considerados sospechosos de tener rickettsiosis, bien sea ocasionada por *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys*, bajo Frotis de Capa Blanca. Cada uno de estos animales se le tomo una muestra sanguínea en tubos tipo Vacutainer en presencia de EDTA al 1 %, se le aisló el ADN a partir de esta sangre completa y se sometió a la prueba de PCR, frente a cebadores específicos que amplifican un fragmento del gen de la proteína ribosomal 16s de Rickettsias. Estos productos de PCR, fueron sembrados en geles de agarosa y digitalizados a fin de su posterior análisis. Estos son los geles que se presentan a continuación:

1.- Estandarización del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En la Figura 4, se presenta un gel de agarosa (1 %) donde fueron sembrados dos muestras probadas previamente como positivas por Nuñez, C. y col. (2003) a fin de establecer las concentraciones óptimas del ADN de la muestra total que se requiere para obtener una mejor amplificación del producto.

En esta figura, se observa que para el primer canino, en CI (10 µl de ADN) la banda correspondiente al fragmento amplificado, es difusa y poco clara. Por otra parte, en CII (5 µl de ADN) la banda se observa más clara que con la concentración anterior, sin embargo en el caso de CIII (1 µl de ADN) y CIV (0.1 µl de ADN) no se observa ninguna banda.

Para el segundo canino, solo se observa el fragmento de ampliación utilizando 5 µl de ADN total en el carril CIV. En el carril CV (10 µl de ADN) se

observa una débil banda mientras que en los carriles CVII (1 μ l de ADN) y CVIII (0.1 μ l de ADN) no presenta ninguna banda amplificada.

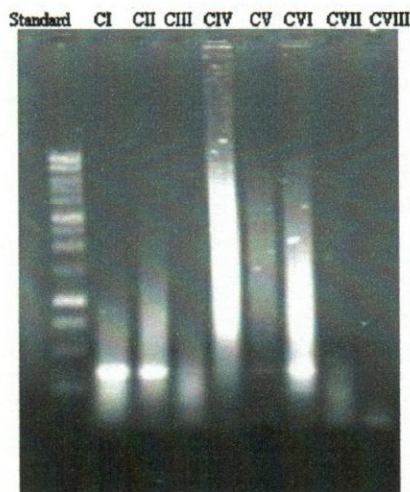


Figura 4

Gel de Agarosa (1 %) digitalizado donde se sembró los estándar de peso en el carril 1 y posteriormente dos caninos en diferentes concentraciones en los carriles CI, CII, CIII, CIV, CV, CVI, CVII y CVIII respectivamente.

Viendo los resultados aquí presentados se determinó que la cantidad de ADN total, ideal a utilizar para la elaboración de las pruebas de PCR es de 5 μ l, partiendo del ADN extraído de las muestras de sangre de cada animal. La cantidad de ADN a utilizar se expresa en unidades de volumen debido a que el ADN bacteriano no es puro, sino que se encuentra contaminado con ADN del animal.

2.- Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplifican el gen de la proteína 16s de Rickettsias.

El la Figura 5, se presenta un gel de agarosa (1 %) donde fueron sembrados las muestras correspondientes a los productos de PCR de los caninos C1, C2, C3, C4, y C5. En esta figura se puede apreciar que en los carriles CIV y CV donde se encuentran las muestras de los caninos identificados como Macuto y Sharon se observa una banda de 345 pb, equivalente a la presentada donde se colocó la muestra de ADN de *A. marginale* como control positivo. Este resultado indica que estos dos

perros contienen ADN de alguna Rickettsias, la cual puede ser *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys*.

En la figura 6, se observan los resultados de los productos de PCR visualizados con la ayuda de un gel de agarosa digitalizado, de los caninos C12, C13, C14, C15, C16 y C17. De estos, solamente León mostró un banda muy amplia a nivel de 345 pb, indicando la presencia de ADN de Rickettsias en la sangre de este animal. A diferencia del caso anterior, la amplificación resultó ser más prominente, indicando quizás la mayor colonización en la sangre por parte de la *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys*. Es posible que el producto PCR de este canino se haya degradado un poco lo que también explicaría porque no se encuentra una banda propiamente dicha, sino más bien una mancha a nivel de 345 pb.

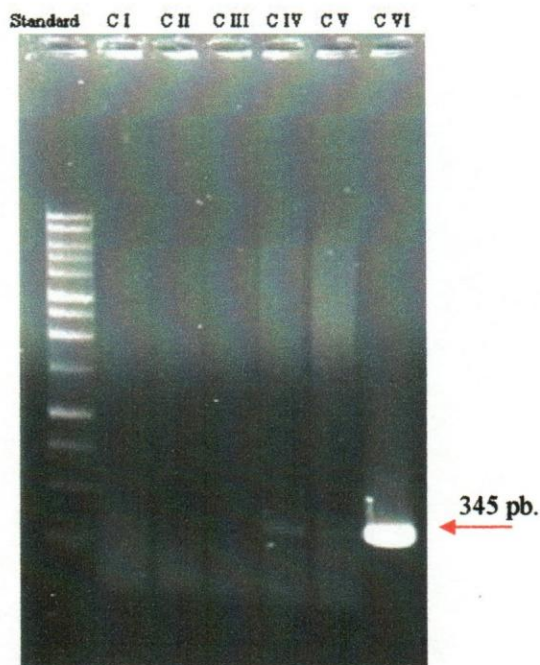


Figura 5

Gel de Agarosa (1 %) digitalizado donde se sembró los estándar de peso en el carril 1 y posteriormente los caninos C1, C2, C3, C4 y C5 en los carriles C1, C2, C3, C4 y C5 respectivamente. En el carril C7 se colocó el producto de PCR del ADN de *A. marginale* como control positivo.

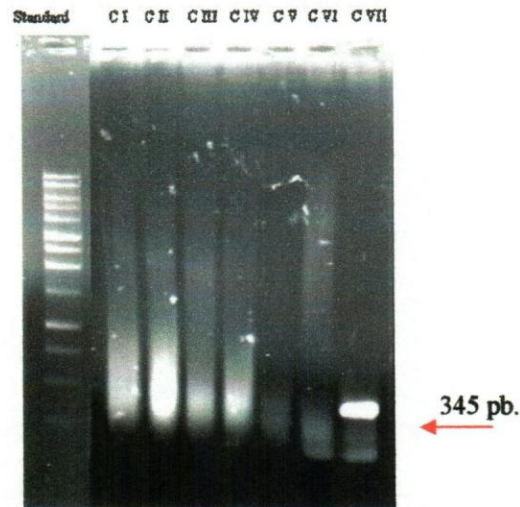


Figura 6

Gel de Agarosa (1 %) digitalizado donde se sembró los estándar de peso en el carril 1 y posteriormente los caninos C12 (carril CI), C13 (carril CII), C14 (carril CIII), C15 (carril CIV), C16 (Carril CV) y C17 (carril CVI) y en el carril (C VII) el control positivo *A. marginal*. En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.

En la Figura 7, se muestra el resultado de la aplicación del método de PCR realizado a una muestra de ADN proveniente de sangre del canino C22 (Rodax). En el carril I (C I), se observa la banda característica de 345 pb posterior al PCR con cebadores específicos para determinar la presencia de *Rickettsias*, a pesar que la banda es bastante débil, lo cual se puede deber a una colonización leve de la rickettsia en la sangre de este animal.



Figura 7

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestra el resultado de la prueba de PCR a partir del ADN proveniente de una muestra de sangre canina C22 utilizando el cebador específico de *Rickettsia*. En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.

3.- Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplifican del gen de la proteína 16s de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*.

Tal y como se indicó en la metodología, una vez que un canino resulta ser positivo por PCR utilizando los cebadores del gen de la proteína 16S de *Rickettsia sp.*, se le realizaba una segunda prueba, donde se utilizan cebadores específicos para amplificar el gen de la proteína 16s de *Anaplasma platys*.

Así tenemos entonces en la Figura 8, el resultado de la ampliación por PCR de un fragmente especie específico de 678 pb, indicando la presencia de ADN de

Ehrlichia canis del canino C4 (CII), el cual, a su vez resulto ser PCR positivo frente a los cebadores para *Rickettsias* (Figura 4, carril CIV).

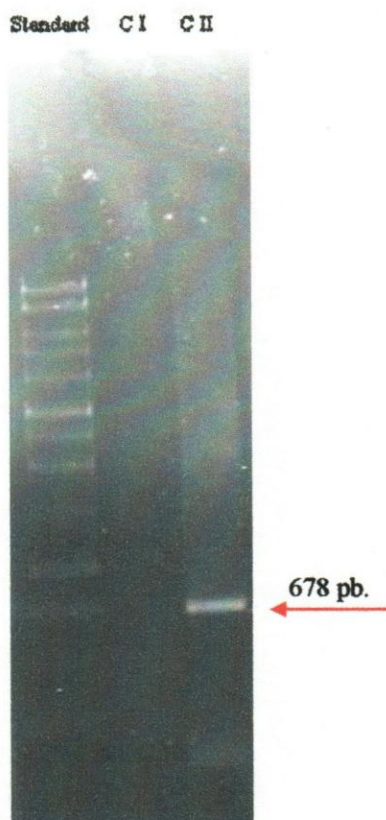


Figura 8

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestra el resultado de la prueba de PCR del canino C4 (CII), utilizando el cebador específico de *Anaplasma platys*. En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.

En la Figura 9, se muestra el producto de amplificación del PCR del canino C5. En esta figura se observa una banda en el carril I (C I) de 678 pb, que indica el resultado positivo a la prueba para el canino C5, quien salió a su vez positiva a la prueba de PCR utilizando el cebador específico para *Rickettsia*, mostrado en la Figura 4, carril V (C V). Este resultado indica la presencia de ADN de *Anaplasma platys* en la sangre de este canino. Sin embargo, al igual que en la Figura 7, la prueba de PCR utilizando el cebador específicos de *Anaplasma platys* no implica que el animal no

esté infectado con *Ehrlichia canis*, dado que es posible la presencia de ambas infecciones en un mismo animal, así como lo explica Nuñez, C. y col. (2003); en el cual uno de los caninos estudiados presentaba tanto *E. canis* como *A. platys* y en el caso de los otros dos animales estudiados solo estaba infectados con una de las bacterias.

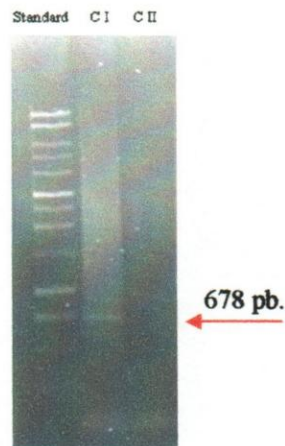


Figura 9

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de los caninos C5 (C I) , utilizando el cebador específico de *Anaplasma platys*. En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.

En la Figura 10, se muestra el gel donde se sembró el producto de amplificación del PCR de los caninos C13. En este gel se observa una banda en el carril C I (Canino León) de 678 pb, que representa el resultado positivo a la prueba de PCR utilizando el cebador de *Anaplasma platys*. Este mismo animal resultó positivo a la prueba de PCR utilizando los cebadores para *Rickettsia canina*, mostrado en el gráfico 5, carril C II.

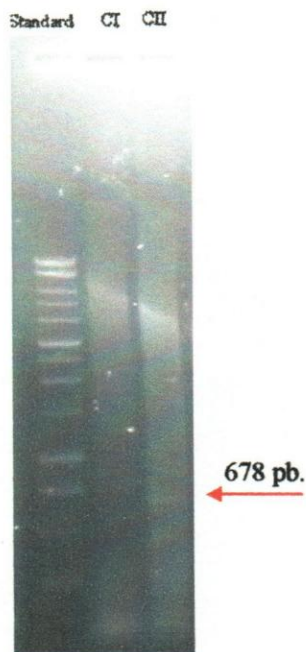


Gráfico 10

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR del canino C13 (CII), utilizando el cebador específico de *Anaplasma platys*. En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.

En la Figura 11, se muestran los resultados obtenidos luego de la aplicación por PCR de una muestra de sangre canina (Rodax) utilizando los cebadores específicos de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*. En el carril I (C I) encontramos el resultado de la prueba de PCR utilizando el cebador específico de *Ehrlichia canis* y en el carril II (C II) el resultado de la prueba de PCR utilizando el cebador específico de *Anaplasma platys*. En esta figura, se observa que la prueba fue positiva ante el cebador de *Ehrlichia canis* y negativa al cebador de *Anaplasma platys*, por lo que se puede deducir que el canino presenta Ehrlichiosis.

En comparación con los anteriores resultados de *Anaplasma platys*, se puede ver que la banda presentada en la figura 11, presenta un peso de aproximadamente 1100 pb, utilizando los cebadores específicos de *E. canis*.

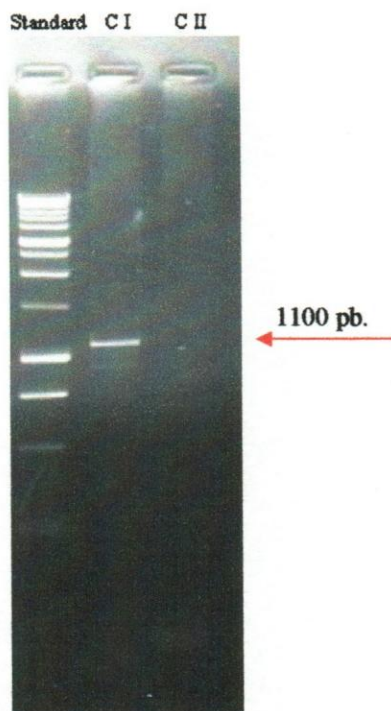


Gráfico 11

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran los resultados de la prueba de PCR del canino C22 utilizando el cebador específico de *Ehrlichia canis* (carril C1) y *Anaplasma platys* (carril C2). En el carril de la izquierda se encuentran los estándares de peso.

A continuación se presenta un cuadro resumen con los datos de los 31 caninos muestreados, indicando el N° que representa el código de identificación de la muestra y por último los resultados de la prueba de PCR obtenidos a lo largo del proceso investigativo.

Tabla 3

**Resumen de los resultados de la aplicación de la prueba de PCR para la
detección de *Rickettsiosis sp.*, en caninos**

N°	PCR		
	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Anaplasma platys</i>
C1	Negativo		
C2	Negativo		
C3	Negativo		
C4	Positivo	Negativo	Positivo
C5	Positivo	Negativo	Positivo
C6	Negativo		
C7	Negativo		
C8	Negativo		
C9	Negativo		
C10	Negativo		
C11	Negativo		
C12	Negativo		
C13	Positivo	Negativo	Positivo
C14	Negativo		
C15	Negativo		
C16	Negativo		
C17	Negativo		
C18	Negativo		
C19	Negativo		
C20	Negativo		
C21	Negativo		
C22	Positivo	Positivo	Negativo
C23	Negativo		
C24	Negativo		
C25	Negativo		
C26	Negativo		
C27	Negativo		
C28	Negativo		
C29	Negativo		
C30	Negativo		
C31	Negativo		

En el cuadro, anteriormente expuesto, se puede observar claramente, que de todos los animales muestreados, tan solo cuatro caninos resultaron positivos a la prueba de PCR utilizando el cebador de *Rickettsia*, y que de ellos, tres son positivos a *Anaplasma platys*, y uno es positivo a *Ehrlichia canis*.

Según los resultados expuestos anteriormente, se pueden deducir dos posibilidades: (1) el frotis de capa blanca al ser una técnica subjetiva y depender de la experiencia del investigador, es un método que posiblemente esté dando falsos positivos, debido a la presencia de artefactos que son confundidos con mórulas de *Ehrlichia canis* y/o *Anaplasma platys*, de allí el motivo por el cual se presentan tantos sospechosos a la enfermedad, bajo ésta técnica, y pocos posibles positivos, según la prueba de PCR; (2) que el método de PCR a pesar de estar amplificando fragmentos de genes de las bacterias, no ha sido lo suficientemente sensible como para dar un diagnóstico veraz ante las muestras de sangre canina. Una posible alternativa que pudiera incrementar la sensibilidad de la prueba, es a través de la realización de un doble PCR o nested – PCR, el cual está claramente demostrado que incrementa la sensibilidad al diagnóstico (Breitschwerdt y col, 1998).

3.- Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplifican el gen de la proteína 16s de Rickettsias, en muestras provenientes de sangre humana.

A fin de probar si la prueba de PCR también resultaría en humanos, seis individuos con exposición constante a picaduras de garrapatas, fueron seleccionados. La prueba de PCR de estos casos, fue realizada en idénticas condiciones a las mencionadas para los caninos, desde la toma de sangre, hasta la prueba de PCR.

Como se observa en la figura 12, tanto en el carril C I como en el carril C II, se visualizan dos bandas que oscilan entre los 250 – 500 pb., que corresponde a las muestras humanas H4 y H6, respectivamente. En los carriles CIII y CIV se observan que las muestras H3 y H5 son negativas.

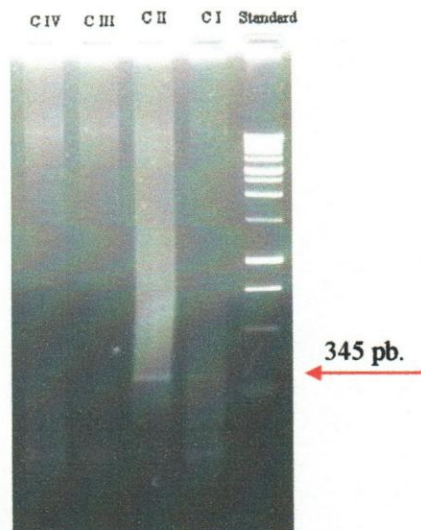


Figura 12

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de cuatro muestras de sangre humana utilizando el cebador específico de *Rickettsia*. En el carril de la derecha se encuentran los estándares de peso.

5.- Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que amplifican del gen de la proteína 16s de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, en muestras provenientes de sangre humana.

En la figura 13, se sembraron los productos de PCR correspondientes a H3 y H4 a los cuales se les realizó la prueba con los cebadores específicos a *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*. En CII se sembró el producto correspondiente a H3 con el cebador específico a *Ehrlichia canis*, en CIII a H3 pero con el cebador específico a *Anaplasma platys*, en CVI H4 con el cebador específico a *Ehrlichia canis* y en CVII a H4 con el cebador específico a *Anaplasma platys*. Se puede observar que de todas las muestras, solo H4 pudiera ser positiva a *Ehrlichia canis*, debido a que en el gel aparece amplificado un fragmento que está alrededor de los 260 pb.

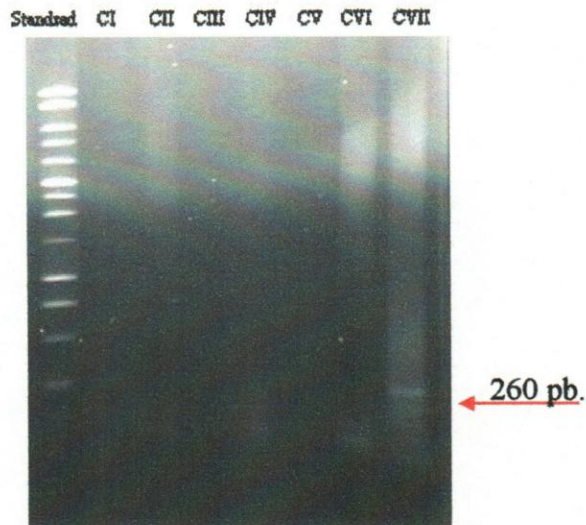


Figura 13

Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de dos muestras de sangre humana utilizando el cebador específico de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*. En el carril CII el cebador específico a *Ehrlichia canis* para H3, CIV el cebador específico a *Anaplasma platys* para H3, CVI el cebador específico a *Ehrlichia canis* para H4 y CVII el cebador específico a *Ehrlichia canis* para H4. En el carril de la derecha se encuentran los estándares de peso.

En la figura 14, en CI se sembró el producto de PCR correspondientes a H6 al cual se le realizó la prueba con el cebador específicos de *Ehrlichia canis*. Se puede observar que la muestra, resultó aparentemente positiva a *Ehrlichia canis*; debido a que en el gel aparece amplificado un fragmento que está alrededor de los 520 pb.

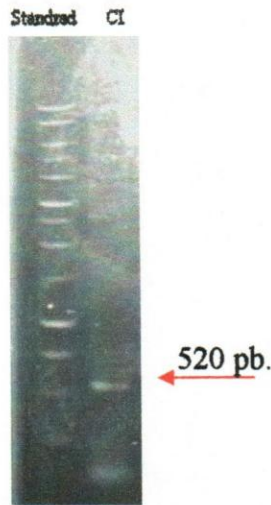


Figura 14
Gel de Agarosa (1 %) donde se muestran el resultado de la prueba de PCR de una muestra de sangre humana utilizando el cebador específico de *Ehrlichia canis*. En el carril de la derecha se encuentran los estándares de peso.

Comparando los dos geles, anteriormente presentados, se puede observar que las bandas no son las mismas, por lo que se pudiese pensar que estamos en presencia de dos especies diferentes de *Ehrlichia* o alguna otra bacteria próxima, desde el punto de vista taxonómico o alguna variedad de *E. canis* no descrita hasta ahora. Obviamente, también existe la posibilidad que esta amplificación mostrada sea algo totalmente inespecífico. Ante esto, es importante destacar que éstas son las primeras pruebas con sangre humana que se están realizando en el país, y por ello, no se tienen muestras controles negativas ni positivas de seres humanos, las cuales permitirían dilucidar esta dos posibilidades.

A continuación se presenta un cuadro resumen con los datos de los 6 humanos muestreados, indicando el N° asignado, y los resultados de la prueba de PCR obtenidos a lo largo del proceso investigativo.

Tabla 4

Resumen de los resultados obtenidos con los humanos estudiados

N°	PCR		
	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Anaplasma platys</i>
H1	Negativo		
H2	Negativo		
H3	Negativo		
H4	Positivo	Positivo	Negativo
H5	Negativo		
H6	Positivo	Positivo	Negativo

En la tabla 4, se puede observar, que de los 6 humanos muestreados, dos de ellos resultaron positivos a la prueba de PCR utilizando el cebador de *Rickettsia*, y que de ellos, dos son positivos a *Ehrlichia canis*, y ninguno es positivo a *Anaplasma platys*.

Los resultados expuestos anteriormente muestran que las bandas de ADN correspondientes a *Rickettsia*, coinciden con lo estipulado por Parola y col. (2000), el cual define que la banda amplificada correspondiente a *Rickettsia sp.*, debe contener 345 pb.

Por otra parte, estudios realizados en nuestro laboratorios, (Nuñez y col. 2003) indican que los fragmentos correspondientes a *Ehrlichia canis*, oscilan entre los 1000 y 1250 pb. (1100 pb.). Esto coincide con lo descrito anteriormente, ya que como se pudo observar con el canino C22, que resultó positivo a *E. canis*, no solo porque los cebadores correspondientes a dicha bacteria lograron amplificar un fragmento específico, sino que también por el peso molecular del fragmento del gen amplificado.

Con respecto a *Anaplasma platys* Inokuma y col. (2000), indica que los fragmentos correspondientes a la amplificación del gen 16S ribosomal de dicha bacteria es de 678 – 679 pb. En éste trabajo, se pudo constatar que efectivamente, el fragmento amplificado es 678 – 679 pb., coincidiendo por lo indicado por Inokuma y col. (2000).

Con los resultados obtenidos anteriormente, se puede evidenciar, una diferencia importante entre los diagnósticos por PCR versus diagnóstico de frotis de capa blanca. Quizás esto se deba a que el frotis es una prueba subjetiva que demanda un alto entrenamiento por parte de quien la ejecuta pudiendo conllevar fácilmente al diagnóstico de falsos positivos. Por otra parte, es posible que debido a la presencia del ADN total con mayor cantidad del ADN del mismo mamífero, pudiera interferir en la prueba de PCR para la detección de las Ehrlichia y/o Anaplasma originando falsos negativos.

Por último, es importante destacar que, independientemente que fuese una técnica u otra, al obtener falsos positivos o falsos negativos se incurre en un error desde el punto de vista clínico, que puede conllevar a graves problemas a las comunidades, no solamente canina, sino también humanas, debido a la mala utilización de tratamientos innecesarios o el empeoramiento de un paciente (canino o humano) por falta de las terapéutica requeridas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo pionero en Venezuela sobre la detección de las *Ehrlichias* y/o *Anaplasma* utilizando la técnica de PCR, nos ha permitido establecer este método como una prueba de diagnóstico y además de ello, también nos ha permitido realizar el diagnóstico diferencial entre ambos microorganismos. Debe destacarse que si bien es cierto, ya se habían realizado en el exterior este tipo de pruebas en perros y humanos de Venezuela, esta es la primera vez que se estandariza la técnica para ser ejecutada en nuestro país.

La presente investigación demostró que el PCR fue capaz de detectar 12,5 % de caninos positivos a alguna de estas dos *Rickettsias*, y de éstos el 75 % presentaba *Anaplasma platys* y el 25 % *Ehrlichia canis*.

Una de los posibles inconvenientes que presenta esta prueba, es que es realizada sobre ADN total extraído a partir de sangre del paciente sospechoso y quizás debido a la gran cantidad de ADN proveniente del mamífero (ADN de leucocitos principalmente) que contienen las muestras, resulta difícil amplificar un fragmento de alguna de estas *Rickettsias* en una prueba de PCR, lo que ocasiona una posible disminución de la sensibilidad de la técnica. Es por ello que se recomienda una prueba de PCR doble o Nested-PCR, el cual aumentaría la sensibilidad, debido a la doble amplificación del fragmento de un gen.

Ahora bien, para el caso de los humanos, se obtuvo que del total de los casos estudiados, el 33,33 % resultó ser positivo a *Rickettsia* y de éstos el 100 % pudiese presentar *Ehrlichia canis*, pero al no disponer de controles positivos para las pruebas en dichas muestras, no es posible dar un resultado veraz, por ello es preciso realizar un proceso de secuenciación de los fragmentos del gen de la proteína amplificada, para así determinar si se trata del microorganismo a estudiarse o de algún otro, que no se haya descrito anteriormente. Esto pudiera explicar el tamaño diferente a lo esperado en los humanos, así como también en el caso que fuera una

amplificación inespecífica, al obtener la secuencia se pudiera conocer por interrogación en bases de datos de nucleótidos, cual es el fragmento amplificado con exactitud.

Es importante destaca que el estudio sobre diagnóstico de estas enfermedades en franco ascenso epidemiológico en Venezuela y el mundo, es fundamental para su tratamiento, estudio y control.

BIBLIOGRAFÍA

- Arraga de Alvarado, C., O. Parra, M. Palmar y P. Salas. 1999. *Diagnóstico de Ehrlichias y Rickettsias Plaquetarias en Animales y Humanos*. Second Symposium on New World Trypanosomes and other hemoparasites.
- Breitschwerdt, E.; Hegarty, B. y Hancock, S. *Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii*. Journal of Clinical Microbiology, 36 (9), 2645 – 2651.
- Dawson, JE; Boggie, KL; Warner, CK; Cookson K; Jenkins S; Levine JF y Olson JG. (1996). *Polymerase chain reaction evidence of Ehrlichia chaffeensis, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia*. American of Journal of Veterinary Research, 57 (8), 1175 – 1179.
- Dumler, J.; Barbet, A. F.; Bekker, C. P. J.; Dasch, G. A.; Palmer, G. H.; Ray, S. C.; Rikihisa, Y.; y Rurangirwa, F. R. (2001). *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 combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 2145 – 2165.
- Hancock, S. I., Breitschwerdt, E. B. y Pitulle, C. 2001. *Differrentiation of Ehrlichia platys and E. equi Infections in Dogs by Using 16S Ribosomal DNA-Based PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 39(12), 4577 – 4578.
- Sampieri, R., Fernández, C. y Baptista, P. *Metodología de la Investigación* (2^{da} ed.). México. 2000.
- Laboratorio Clínico ROE. (2003). *Biología Molecular la revolución del PCR*. [Online]. Disponible en: <http://www.labroe.com/boletines/boletin1/pcr.htm>.

- Massung, R. F. y Slater, K. G. 2003. *Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, Anaplasma phagocytophilum*. Journal of Clinical Microbiology, 41(2), 717 – 722.
- Núñez, C., Celma, V., Ramirez, D., Reyna – Bello, A. (2003) *Diagnóstico diferencial entre Ehrlichia canis y Anaplasma platys mediante la técnica de PCR*. ASOVAC.
- Parola, P., Besti, L., Cambon, M., Brouqui, P. y Raoult, D. *Ehrlichia DNA Amplified from Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in France*. Journal of Medical Entomology, 35 (2), 180 – 183.
- Parola, P., V. Roux, JL. Camicas, I. Baradji, P. Brouqui y D. Raoult. (2000). *Detection of Ehrlichiae in Africa ticks by polymerase chain reaction*. Transactions of The Royal Society of Tropical Medical and Hygiene, 94, 707 – 708.
- Parra, O. Curso sobre “Nuevas estrategias para el estudio y diagnóstico de los hemoparásitos de interés veterinario”. 2003.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. *Microbiología* (4ª ed.). Madrid / España. 1999.
- Preziosi, D. E. y Cohn, L. A. (2002). *The Increasingly complicated Store of Ehrlichia*. Small Animal/Exotics, 24(4), 277 – 289.
- Ristic, M. y Kreier, J. P. (1984). *Family III. Anaplasmataceae*. Dans. Bergey's manual of sistematic bacteriology, 1, 719 – 729.
- Roche Chile – Tecnología Apicolor PCR. (2003). ¿Qué es PCR? [On-line]. Disponible en: <http://www.roche.cl/diagnostics/tecnologia.htm>
- Salvat Editores. *Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas* (12ª ed.). Barcelona / España.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (2ª ed.). Inglaterra.
- Suksawat, J.; Pitulle, C.; Arraga-Alvarado, C.; Madrigal, K.; Hancock, S. I. y Breitschwerdt, E. B. 2001. *Coinfection with Three Ehrlichia Species in Dogs*

from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA Secondary Structure. Journal of Clinical Microbiology, 39(1), 90 – 93.

University of Sheffield IT Comité. (2003). History of PCR. [On-line]. Disponible en: <http://usitweb.shef.ac.uk/~mba97cmh/history/history.htm>

Unver, A.; Pérez M.; Orellana, N.; Huang, H. y Rikihisa, Y. (2001). *Molecular and Antigenic Comparison of Ehrlichia canis Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. Journal of Clinical Microbiology, 39 (8), 2788 – 2793.*