UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Identificación molecular de organismos Rickettsiales en caninos de diferentes regiones de Venezuela.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Chacón Yaremis como requisito parcial para optar al titulo de Licenciado en Biología

Tutor(a)(es): Dr. Armando Reyna
Dra. Palmira Guevara

CARACAS- VENEZUELA

ENERO-2013

DEDICATORIA

A mis amados Padres, por ser mi fuente de inspiración cada día, por brindarme su amor, su apoyo incondicional y por darme la vida. Doy cada día las gracias a Dios por darme el privilegio de que pueda llamarlos Mamá y Papá.

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar le agradezco a Dios por darme la vida y permitirme llegar a este momento tan especial en el que una de mis metas más preciadas es cumplida.

- Les agradezco a mis padres Aracelis y Richard por su paciencia y por brindarme su amor, su apoyo, su cariño y su confianza a pesar de que no pudieron estar cada día a mi lado como hubiesen querido. Sé que hicieron todo lo que estaba en sus manos para que culminara satisfactoriamente mi carrera y por ello estaré siempre muy agradecida. A ustedes les debo todo lo que soy. Siempre estuvieron en los momentos buenos, malos y peores, por eso y muchas cosas más los quiero y amo infinitamente.

- A mis hermanas Yorkeilis y Yelismar por siempre brindarme su apoyo, su cariño, su paciencia y darme aliento en los momentos en que me sentía estresada. Las quiero.

- A mis abuelos María Elena y Carlos por haberme abierto las puertas de su casa para poder facilitar mi ida a la universidad durante toda la carrera, por su amor, su paciencia, su apoyo y por siempre desearme lo mejor. Los quiero mucho y les estaré eternamente agradecida.

- A mi abuela Emelina por su apoyo, paciencia, cariño y por siempre desearme lo mejor.

- A mis tías Carolina, Yocelín, Yerlid, Betzaida, Carla y mis tios David, Javier, Luciano, Carlos, por siempre desearme lo mejor y brindarme su cariño y su valioso apoyo. Por siempre poner una sonrisa en mi rostro con sus ocurrencias. Los quiero.

- A mis primas y primos, sobrinitos y ahijados por su cariño y por llenarme de bellos momentos todo este tempo. Los quiero.

- A la dirección del IDECYT por permitirme quedarme en la residencia del instituto para poder culminar los experimentos de mi trabajo especial de grado.

- Agradezco al Dr. Armando Reyna por abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunobiologia para poder llevar a cabo este trabajo de investigación y por su valiosa PACIENCIA, su apoyo, su confianza, por motivarme a seguir adelante, por sus consejos oportunos y por su ayuda.

- A la Dra. Palmira Guevara por ayudarme en todo el proceso de maduración de este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su paciencia, su apoyo, sus consejos y por darme motivación.

- A la Lic. Omaira Parra por facilitarme las muestras sanguíneas de los canes para realizar los análisis moleculares del presente trabajo de investigación, por brindarme sus valiosos consejos y conocimientos respecto al mundo de las Ehrlichias.

- Al Dr. Bernardo González, Dra. Marta Mendoza, Lic. Mariana Eleizalde, Lic. David Rosales y la Lic. Lucinda Tavares, por sus valiosos consejos, por su amistad y por brindarme en el momento oportuno sus conocimientos en el mundo de la ciencia.

- A mis amigos Zurima, Karelys, María, Eleinis, Jennifer, Raibel, Kimberlyn, Migdelys, Carolina, Ana Victoria, Robert, Alejandro, Roberto y Erick por su gran amistad durante casi toda la carrera, por su apoyo y por compartir muy buenos momentos juntos.

INDICE GENERAL

RESUMEN……XII

LISTADO DE ABREVIATURAS……...…..…XIV

1. INTRODUCCIÓN……...……1

1.1. Las enfermedades Rickettsiales…...……..1

1.2. La Rickettsiosis Canina y sus principales vectores……....1

1.3. Taxonomía y características generales de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*....5

1.4. Ciclo biológico de las Rickettsias. Aspectos clínicos y síntomas de la Rickettsiosis Canina…….……..……6

1.5. Diagnóstico de la Rickettsiosis Canina……10

1.6. Tratamiento de la infección Rickettsial Canina……15

2. ANTECEDENTES.....17

3. OBJETIVOS……..26

4. MATERIALES Y MÉTODOS…….27

Esquema general de la metodología empleada…….....27

4.1. Obtención y conservación de la muestra…….28

4.1.1. Muestras controles de ADN analizadas en el estudio…….…….....28

4.2. Extracción de ADN genómico…….29

4.3. Cuantificación de ADN genómico……..29

4.4. Ensayos moleculares. PCR del gen ARNr 16S de las Rickettsias *E. canis* y *A. platys*…….……..30

4.4.1. Normalización del ensayo de la PCR–anidada del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie-específicos *A. platys*-s/*E. canis*-s/SEPas (Beall y col, 2008)……..……..…30

4.4.2. Normalización del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col, 2001)……...32

4.4.3. Diseño de cebadores del nuevo ensayo PCR para la amplificación del gen ARNr 16S de las Rickettsias……..……..33

4.4.3.1. Normalización del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S…….33

4.4.3.2. Determinación de la especificidad y la sensibilidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S……..….34

4.4.4. Evaluación de los productos de amplificación de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa……35

4.4.5. Purificación del producto PCR……...…35

4.4.6. Secuenciación e identificación de Rickettsias……..…….36

4.4.7. Análisis del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S……..…36

4.4.7.1. Reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP……..…….37

5. RESULTADOS……..39

5.1. Obtención de muestras y purificación de ADNs……...……39

5.2. Alineamientos de secuencias del gen ARNr 16S y ubicación de los cebadores de las pruebas de PCR reportadas por Beall y col. 2008 y Parola y col. 2001……..….41

5.3. Normalización de las pruebas de PCR-anidada (Beall y col., 2008) y PCR convencional (Parola y col., 2001), en base al gen ARNr 16S de las Rickettsias…….....47

5.3.1. Normalización de la PCR-anidada (Beall y col. 2008)…….….47

5.3.2. Normalización de la PCR convencional (Parola y col. 2001)…….....53

5.4. Desarrollo y normalización del ensayo PCR-RFLP……..……58

5.4.1. Diseño de cebadores genéricos del nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S. Análisis *in sílico*……58

5.4.2. Normalización del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S……...…….60

5.4.3. Nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S……..…….62

5.4.3.1 Especificidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR convencional del gen ARNr 16S…….…..64

5.4.3.2. Sensibilidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR convencional del gen ARNr 16S……....66

5.4.4. Desarrollo del ensayo PCR-RFLP sobre el gen ARNr 16S. Análisis *in sílico*…….…67

5.4.4.1. Evaluación de la funcionalidad del ensayo PCR-RFLP……70

5.4.4.2. Reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP……..….71

5.5. Identificación de Rickettsias mediante secuenciación…….....72

5.5.1. Análisis de restricción *in sílico* con las secuencias obtenidas de *E. canis* y *A. platys*…….……..82

6. DISCUSIÓN……...85

7. CONCLUSIONES…….95

8. RECOMENDACIONES……...97

9. BIBLIOGRAFÍA……...98

10. ANEXOS…….....109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de la garrapata marrón del perro *R. sanguineus*……8

Figura 2. Esquema general de la instauración de la parasitemia del organismo Rickettsial en las células diana……10

Figura 3. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores GEPs y GEPas…….43

Figura 4. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores EHR16SD y EHR16SR……44

Figura 5. Alineamiento de dos secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis* (EF195135.1 y AF162860.1) con los cebadores *E. canis*- específicos *E. canis*-s y SEPas. …….45

Figura 6. Alineamiento de dos secuencias del gen ARNr 16S de *A. platys* (AY077619.1 y EF139459.1) con los cebadores *A. platys*-s y SEPas.……..…….....46

Figura 7. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas y determinación de la temperatura óptima de alineamiento en el ensayo PCR ARNr 16S.…….……..……...50

Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas comparando las ADN polimerasas *Taq* platinum y Go *Taq*. ……...50

Figura 9. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas variando la concentración de dNTPs. ……...…… 51

Figura 10. Determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo PCR ARNr 16S para la identificación de Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores GEPs y GEPas. ……..……52

Figura 11. Ensayo control. Determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores GEPs y GEPas. ……...……...52

Figura 12. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR en el ensayo PCR ARNr 16S. ……55

Figura 13. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR incrementando la concentración de dNTPs.……....56

Figura 14. Ensayo control. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR en el ensayo PCR ARNr 16S. ……....56

Figura 15. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SF titulando la concentración de $MgCl_2$. ……..…57

Figura 16. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocitophilum*, *E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores genéricos RYaR16S y RYaR16S…….....59

Figura 17. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores RYaF16S y RYaR16S y determinación de la temperatura óptima de alineamiento en el nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S…….……62

Figura 18. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYR16S del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. ……. 63

Figura 19. Especificidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores RYaF16S y RYaR16S…….…..65

Figura 20. Sensibilidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores RYaF16S y RYaR16S.…….…….66

Figura 21. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis*……....68

Figura 22. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *A. platys.* …….69

Figura 23. Funcionalidad del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. ……...71

Figura 24. Especificidad del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con la enzima *Xho*I.……...…….72

Figura 25. Alineamiento de las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas para las muestras de *E. canis.*…….…….....74

Figura 26. Alineamiento de las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas para las muestras de *A. platys*……..……...76

Figura 27. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes cepas de *A. platys* reportadas en el GenBank con la cepa *A. platys* 1112 obtenida en este trabajo de investigación.....79

Figura 28. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes cepas de *E. canis* reportadas en el GenBank con la cepa *E. canis* 1101 obtenida en este trabajo de investigación.……...……81

Figura 29. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* 1101 obtenida en este trabajo……...83

Figura 30. Mapa de restricción de la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *A. platys* 1112 obtenida en este trabajo……..…84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vectores responsables de la transmisión de organismos Rickettsiales……..…4

Tabla 2. Ubicación de los cebadores genéricos GEPs y GEPas (Eddlestone y col., 2007) y los especie-específicos *A. platys*-s/ *E. canis*-s/ SEPas (Dawson y col., 1996) en la secuencia del gen ARNr 16S.....31

Tabla 3. Ubicación de los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2001) en la secuencia del gen ARNr 16S.…….……32

Tabla 4. Resultados de la evaluación clínica, parasitológica y molecular, hechas previamente a las muestras empleadas en los ensayos moleculares del trabajo de investigación.…….…….……40

Tabla 5. Números de acceso al GenBank y número de nucleótidos que conforman las secuencias parciales del gen ARNr 16S de diversas Rickettsias, usadas el alineamiento que permitió establecer la secuencia consenso para la selección de los cebadores genéricos del ensayo PCR ARNr 16S…….41

Tabla 6. Características de los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los espcie-específicos *E. canis*-s/*A. platys*-s/SEPas para el ensayo PCR-anidado ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*..……..……48

Tabla 7. Condiciones del ciclado del ensayo PCR-anidado ARNr 16S con los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Beall y col., 2008)…..…….48

Tabla 8. Temperatura de alineamiento de los cebadores tanto genéricos: GEPs y GEPas como especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Beall y col., 2008)….....48

Tabla 9. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR-anidado ARNr 16S tanto con los cebadores genéricos: GEPs y GEPas como con los especie específicos: *A.platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Facilitado por la Dra. Omaira Parra)…… …..…49

Tabla 10. Características de los cebadores EHR16SF y EHR16SR para el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*.....……..…53

Tabla 11. Condiciones del ciclado del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2000)…….54

Tabla 12. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2000)……...…….54

Tabla 13. Características de los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S para el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*……...……60

Tabla 14. Condiciones del ciclado del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos diseñados RYaF16S y RYaR16S. …….…….61

Tabla 15. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S……...….61

RESUMEN

La Ehrlichiosis Monocitotrópica Canina y la Anaplasmosis Trombocitotrópica Cíclica son enfermedades febriles transmitidas por la garrapata marrón del perro *Riphicephalus sanguineus*, cuyos agentes etiológicos son organismos Rickettsiales de la familia Anaplasmataceae de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*: *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* respectivamente. Estas Rickettsias están ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales y representan un problema de salud emergente al generar enfermedades de gran importancia veterinaria, debido a que las especies de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son potencialmente zoonóticas. En Venezuela se han hecho estudios sobre la prevalencia de estas Rickettsias y de su posible repercusión en la salud humana, tanto en caninos como en humanos, lo que hace de su estudio enfocado en el diagnóstico molecular un importante aporte en la solución a este problema de salud pública. El diagnóstico de estos microorganismos se basa principalmente en la observación clínica del animal, así como también mediante técnicas hematológicas como el frotis de capa blanca con coloración tipo Romanovski; pruebas serológicas, flujo lateral (Snap IDEXX) y por último mediante técnicas moleculares, como es el caso del ensayo PCR. En Venezuela el frotis sanguíneo con coloración Giemsa es la metodología más empleada en el diagnóstico y en menor grado las pruebas moleculares, a pesar de su alta especificidad y sensibilidad, por lo que el principal objetivo de este trabajo estuvo dirigido en identificar molecularmente organismos Rickettsiales en canes de diferentes regiones de Venezuela, mediante PCR y secuenciación dirigidos al gen del ARNr 16S. Inicialmente, se evaluaron los cebadores de diversos ensayos PCR, a fin de seleccionar los de mejor desempeño. Seguidamente, se empleó el programa en línea "Multaling" y se alinearon las secuencias del ARNr16S tanto de *E. canis* como de *A. platys* y posteriormente utilizando el "Oligoexplorer" se diseñaron los cebadores específicos RYaF16S y RYaR16S. Posteriormente, los amplicones de 4 muestras de *E. canis* y de 5 de *A. platys* fueron secuenciados, analizados y comparados con las secuencias reportadas del gen ARNr 16S de estas Rickettsias en el GenBank. Detectamos luego de estos análisis una similaridad del 100% entre la cepa de *A. platys* obtenida y la reportada en Maracay, mientras que la cepa de *E. canis* presentó un alto grado de similaridad (99,8%) con el aislado *E. canis* Brazil-CO2 y los aislados Venezolanos *E. canis* VHE y VDE, difiriendo sin embargo en un nucleótido de la

posición 808 con estos dos últimos, lo que sugiere que el aislado obtenido es diferente a los reportados en el país. Adicionalmente, basados en el análisis *in sílico* del polimorfismo en los sitios de restricción del gen ARNr 16S se escogió a la enzima *Xho*I para el diseño de un ensayo PCR-RFLP empleando el producto amplificado d 1450 pb por los iniciadores RYaF16S y RYaR16S. Como resultado se obtuvo que la secuencia de *A. platys* contiene dos sitios de corte para *Xho*I en la región amplificada y genera 3 fragmentos de 700, 600 y 150 pb. Por su parte el amplicón de *E. canis* contiene un solo sitio de corte generando un patrón específico de 2 bandas de 1300 y 150 pb. Las 5 muestras de *A. platys* y las 4 muestras de *E. canis* fueron evaluadas con este ensayo PCR-RFLP, permitiendo la identificación de *A. platys* en 4 de las muestras y de *E. canis* en las 4 muestras, demostrando que tanto la estrategia PCR-Secuenciación como la del PCR-RFLP desarrolladas en este trabajo permitieron la identificación especie-específica de estos organismos Rickettsiales y que representan una herramienta muy útil para el diagnóstico diferencial de los organismos Rickettsiales encontrados en Venezuela.

LISTADO DE ABREVIATURAS

EGC: Ehrlichiosis granulocíticas canina

EHG: Ehrlichiosis humana granulocítica

EMC: Ehrlichiosis monocítica canina

Taq: Thermus acuaticus

ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucléico

EDTA: etil dietil triadenosin

pb: pares de bases

µm: micrómetro

seg: segundos

min: minuto

mL: mililitro

ng: nanogramo

mM: milimolar

µM: micromolar

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

$MgCl_2$: cloruro de magnesio

Tm: temperatura de melting

Tf: temperatura de fusión

Kb: kilobases

G: guanina

C: citosina

RO: Rowaldo (Can evaluado)

V: voltios

EMBOSS GUI: European Molecular Biology Open Software Suite

Blast: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

DEDICATORIA

A mis amados Padres, por ser mi fuente de inspiración cada día, por brindarme su amor, su apoyo incondicional y por darme la vida. Doy cada día las gracias a Dios por darme el privilegio de que pueda llamarlos Mamá y Papá.

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar le agradezco a Dios por darme la vida y permitirme llegar a este momento tan especial en el que una de mis metas más preciadas es cumplida.

- Les agradezco a mis padres Aracelis y Richard por su paciencia y por brindarme su amor, su apoyo, su cariño y su confianza a pesar de que no pudieron estar cada día a mi lado como hubiesen querido. Sé que hicieron todo lo que estaba en sus manos para que culminara satisfactoriamente mi carrera y por ello estaré siempre muy agradecida. A ustedes les debo todo lo que soy. Siempre estuvieron en los momentos buenos, malos y peores, por eso y muchas cosas más los quiero y amo infinitamente.

- A mis hermanas Yorkeilis y Yelismar por siempre brindarme su apoyo, su cariño, su paciencia y darme aliento en los momentos en que me sentía estresada. Las quiero.

- A mis abuelos María Elena y Carlos por haberme abierto las puertas de su casa para poder facilitar mi ida a la universidad durante toda la carrera, por su amor, su paciencia, su apoyo y por siempre desearme lo mejor. Los quiero mucho y les estaré eternamente agradecida.

- A mi abuela Emelina por su apoyo, paciencia, cariño y por siempre desearme lo mejor.

- A mis tías Carolina, Yocelín, Yerlid, Betzaida, Carla y mis tios David, Javier, Luciano, Carlos, por siempre desearme lo mejor y brindarme su cariño y su valioso apoyo. Por siempre poner una sonrisa en mi rostro con sus ocurrencias. Los quiero.

- A mis primas y primos, sobrinitos y ahijados por su cariño y por llenarme de bellos momentos todo este tempo. Los quiero.

- A la dirección del IDECYT por permitirme quedarme en la residencia del instituto para poder culminar los experimentos de mi trabajo especial de grado.

- Agradezco al Dr. Armando Reyna por abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunobiologia para poder llevar a cabo este trabajo de investigación y por su valiosa PACIENCIA, su apoyo, su confianza, por motivarme a seguir adelante, por sus consejos oportunos y por su ayuda.

- A la Dra. Palmira Guevara por ayudarme en todo el proceso de maduración de este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su paciencia, su apoyo, sus consejos y por darme motivación.

- A la Lic. Omaira Parra por facilitarme las muestras sanguíneas de los canes para realizar los análisis moleculares del presente trabajo de investigación, por brindarme sus valiosos consejos y conocimientos respecto al mundo de las Ehrlichias.

- Al Dr. Bernardo González, Dra. Marta Mendoza, Lic. Mariana Eleizalde, Lic. David Rosales y la Lic. Lucinda Tavares, por sus valiosos consejos, por su amistad y por brindarme en el momento oportuno sus conocimientos en el mundo de la ciencia.

- A mis amigos Zurima, Karelys, María, Eleinis, Jennifer, Raibel, Kimberlyn, Migdelys, Carolina, Ana Victoria, Robert, Alejandro, Roberto y Erick por su gran amistad durante casi toda la carrera, por su apoyo y por compartir muy buenos momentos juntos.

INDICE GENERAL

RESUMEN……..……XII

LISTADO DE ABREVIATURAS……...…..…XIV

1. INTRODUCCIÓN……...……1

1.1. Las enfermedades Rickettsiales…...……..1

1.2. La Rickettsiosis Canina y sus principales vectores……....1

1.3. Taxonomía y características generales de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*....5

1.4. Ciclo biológico de las Rickettsias. Aspectos clínicos y síntomas de la Rickettsiosis Canina…….……...……6

1.5. Diagnóstico de la Rickettsiosis Canina……10

1.6. Tratamiento de la infección Rickettsial Canina……15

2. ANTECEDENTES.....17

3. OBJETIVOS……..26

4. MATERIALES Y MÉTODOS…….27

Esquema general de la metodología empleada…….....27

4.1. Obtención y conservación de la muestra…….28

4.1.1. Muestras controles de ADN analizadas en el estudio…….…….....28

4.2. Extracción de ADN genómico…….29

4.3. Cuantificación de ADN genómico……..29

4.4. Ensayos moleculares. PCR del gen ARNr 16S de las Rickettsias *E. canis* y *A. platys*…….……..30

4.4.1. Normalización del ensayo de la PCR–anidada del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie-específicos *A. platys*-s/*E. canis*-s/SEPas (Beall y col, 2008)……..……..…30

4.4.2. Normalización del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col, 2001)……...32

4.4.3. Diseño de cebadores del nuevo ensayo PCR para la amplificación del gen ARNr 16S de las Rickettsias……..……..33

4.4.3.1. Normalización del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S…….33

4.4.3.2. Determinación de la especificidad y la sensibilidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S……..….34

4.4.4. Evaluación de los productos de amplificación de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa……35

4.4.5. Purificación del producto PCR……..…35

4.4.6. Secuenciación e identificación de Rickettsias……..…….36

4.4.7. Análisis del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S……..…36

4.4.7.1. Reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP……..…….37

5. RESULTADOS……..39

5.1. Obtención de muestras y purificación de ADNs……...……39

5.2. Alineamientos de secuencias del gen ARNr 16S y ubicación de los cebadores de las pruebas de PCR reportadas por Beall y col. 2008 y Parola y col. 2001……..….41

5.3. Normalización de las pruebas de PCR-anidada (Beall y col., 2008) y PCR convencional (Parola y col., 2001), en base al gen ARNr 16S de las Rickettsias…….....47

5.3.1. Normalización de la PCR-anidada (Beall y col. 2008)…….….47

5.3.2. Normalización de la PCR convencional (Parola y col. 2001)…….....53

5.4. Desarrollo y normalización del ensayo PCR-RFLP……..……58

5.4.1. Diseño de cebadores genéricos del nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S. Análisis *in sílico*……58

5.4.2. Normalización del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S……...…….60

5.4.3. Nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S……..…….62

5.4.3.1 Especificidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR convencional del gen ARNr 16S…….…..64

5.4.3.2. Sensibilidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR convencional del gen ARNr 16S……....66

5.4.4. Desarrollo del ensayo PCR-RFLP sobre el gen ARNr 16S. Análisis *in sílico*…….…67

5.4.4.1. Evaluación de la funcionalidad del ensayo PCR-RFLP……70

5.4.4.2. Reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP……..….71

5.5. Identificación de Rickettsias mediante secuenciación…….....72

5.5.1. Análisis de restricción *in sílico* con las secuencias obtenidas de *E. canis* y *A. platys*…….……..82

6. DISCUSIÓN……...85

7. CONCLUSIONES…….95

8. RECOMENDACIONES……...97

9. BIBLIOGRAFÍA……...98

10. ANEXOS…….....109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de la garrapata marrón del perro *R. sanguineus*……8

Figura 2. Esquema general de la instauración de la parasitemia del organismo Rickettsial en las células diana……10

Figura 3. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores GEPs y GEPas…….43

Figura 4. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores EHR16SD y EHR16SR……44

Figura 5. Alineamiento de dos secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis* (EF195135.1 y AF162860.1) con los cebadores *E. canis*- específicos *E. canis*-s y SEPas. …….45

Figura 6. Alineamiento de dos secuencias del gen ARNr 16S de *A. platys* (AY077619.1 y EF139459.1) con los cebadores *A. platys*-s y SEPas.……..…….....46

Figura 7. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas y determinación de la temperatura óptima de alineamiento en el ensayo PCR ARNr 16S.…….……..……...50

Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas comparando las ADN polimerasas *Taq* platinum y Go *Taq*. ……...50

Figura 9. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas variando la concentración de dNTPs. ……...…… 51

Figura 10. Determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo PCR ARNr 16S para la identificación de Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores GEPs y GEPas. ……..……52

Figura 11. Ensayo control. Determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores GEPs y GEPas. ……...……...52

Figura 12. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR en el ensayo PCR ARNr 16S. …….……55

Figura 13. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR incrementando la concentración de dNTPs.……....56

Figura 14. Ensayo control. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR en el ensayo PCR ARNr 16S. ……....56

Figura 15. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SF titulando la concentración de $MgCl_2$. ……..…57

Figura 16. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores genéricos RYaR16S y RYaR16S…….....59

Figura 17. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores RYaF16S y RYaR16S y determinación de la temperatura óptima de alineamiento en el nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S…….……62

Figura 18. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYR16S del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. ……. 63

Figura 19. Especificidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores RYaF16S y RYaR16S…….…..65

Figura 20. Sensibilidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores RYaF16S y RYaR16S.….…….66

Figura 21. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis*……....68

Figura 22. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *A. platys.* …….69

Figura 23. Funcionalidad del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. ……...71

Figura 24. Especificidad del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con la enzima *Xho*I.……...…….72

Figura 25. Alineamiento de las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas para las muestras de *E. canis.*…….…….....74

Figura 26. Alineamiento de las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas para las muestras de *A. platys*……...……...76

Figura 27. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes cepas de *A. platys* reportadas en el GenBank con la cepa *A. platys* 1112 obtenida en este trabajo de investigación.....79

Figura 28. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes cepas de *E. canis* reportadas en el GenBank con la cepa *E. canis* 1101 obtenida en este trabajo de investigación.……...……81

Figura 29. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* 1101 obtenida en este trabajo……...83

Figura 30. Mapa de restricción de la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *A. platys* 1112 obtenida en este trabajo……..…84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vectores responsables de la transmisión de organismos Rickettsiales……..…4

Tabla 2. Ubicación de los cebadores genéricos GEPs y GEPas (Eddlestone y col., 2007) y los especie-específicos *A. platys*-s/ *E. canis*-s/ SEPas (Dawson y col., 1996) en la secuencia del gen ARNr 16S.....31

Tabla 3. Ubicación de los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2001) en la secuencia del gen ARNr 16S.…….……32

Tabla 4. Resultados de la evaluación clínica, parasitológica y molecular, hechas previamente a las muestras empleadas en los ensayos moleculares del trabajo de investigación.…….…….……40

Tabla 5. Números de acceso al GenBank y número de nucleótidos que conforman las secuencias parciales del gen ARNr 16S de diversas Rickettsias, usadas el alineamiento que permitió establecer la secuencia consenso para la selección de los cebadores genéricos del ensayo PCR ARNr 16S…….41

Tabla 6. Características de los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los espcie-específicos *E. canis*-s/*A. platys*-s/SEPas para el ensayo PCR-anidado ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma.*……..……48

Tabla 7. Condiciones del ciclado del ensayo PCR-anidado ARNr 16S con los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Beall y col., 2008)….....…….48

Tabla 8. Temperatura de alineamiento de los cebadores tanto genéricos: GEPs y GEPas como especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Beall y col., 2008)….....48

Tabla 9. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR-anidado ARNr 16S tanto con los cebadores genéricos: GEPs y GEPas como con los especie específicos: *A.platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Facilitado por la Dra. Omaira Parra)…… ….…49

Tabla 10. Características de los cebadores EHR16SF y EHR16SR para el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*.....……..…53

Tabla 11. Condiciones del ciclado del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2000)…….54

Tabla 12. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2000)……...…….54

Tabla 13. Características de los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S para el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*……...……60

Tabla 14. Condiciones del ciclado del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos diseñados RYaF16S y RYaR16S. …….…….61

Tabla 15. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S……...….61

RESUMEN

La Ehrlichiosis Monocitotrópica Canina y la Anaplasmosis Trombocitotrópica Cíclica son enfermedades febriles transmitidas por la garrapata marrón del perro *Riphicephalus sanguineus*, cuyos agentes etiológicos son organismos Rickettsiales de la familia Anaplasmataceae de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*: *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* respectivamente. Estas Rickettsias están ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales y representan un problema de salud emergente al generar enfermedades de gran importancia veterinaria, debido a que las especies de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son potencialmente zoonóticas. En Venezuela se han hecho estudios sobre la prevalencia de estas Rickettsias y de su posible repercusión en la salud humana, tanto en caninos como en humanos, lo que hace de su estudio enfocado en el diagnóstico molecular un importante aporte en la solución a este problema de salud pública. El diagnóstico de estos microorganismos se basa principalmente en la observación clínica del animal, así como también mediante técnicas hematológicas como el frotis de capa blanca con coloración tipo Romanovski; pruebas serológicas, flujo lateral (Snap IDEXX) y por último mediante técnicas moleculares, como es el caso del ensayo PCR. En Venezuela el frotis sanguíneo con coloración Giemsa es la metodología más empleada en el diagnóstico y en menor grado las pruebas moleculares, a pesar de su alta especificidad y sensibilidad, por lo que el principal objetivo de este trabajo estuvo dirigido en identificar molecularmente organismos Rickettsiales en canes de diferentes regiones de Venezuela, mediante PCR y secuenciación dirigidos al gen del ARNr 16S. Inicialmente, se evaluaron los cebadores de diversos ensayos PCR, a fin de seleccionar los de mejor desempeño. Seguidamente, se empleó el programa en línea "Multaling" y se alinearon las secuencias del ARNr16S tanto de *E. canis* como de *A. platys* y posteriormente utilizando el "Oligoexplorer" se diseñaron los cebadores específicos RYaF16S y RYaR16S. Posteriormente, los amplicones de 4 muestras de *E. canis* y de 5 de *A. platys* fueron secuenciados, analizados y comparados con las secuencias reportadas del gen ARNr 16S de estas Rickettsias en el GenBank. Detectamos luego de estos análisis una similaridad del 100% entre la cepa de *A. platys* obtenida y la reportada en Maracay, mientras que la cepa de *E. canis* presentó un alto grado de similaridad (99,8%) con el aislado *E. canis* Brazil-CO2 y los aislados Venezolanos *E. canis* VHE y VDE, difiriendo sin embargo en un nucleótido de la posición 808 con estos dos últimos, lo que sugiere que el aislado obtenido es diferente a

los reportados en el país. Adicionalmente, basados en el análisis *in sílico* del polimorfismo en los sitios de restricción del gen ARNr 16S se escogió a la enzima *Xho*I para el diseño de un ensayo PCR-RFLP empleando el producto amplificado d 1450 pb por los iniciadores RYaF16S y RYaR16S. Como resultado se obtuvo que la secuencia de *A. platys* contiene dos sitios de corte para *Xho*I en la región amplificada y genera 3 fragmentos de 700, 600 y 150 pb. Por su parte el amplicón de *E. canis* contiene un solo sitio de corte generando un patrón específico de 2 bandas de 1300 y 150 pb. Las 5 muestras de *A. platys* y las 4 muestras de *E. canis* fueron evaluadas con este ensayo PCR-RFLP, permitiendo la identificación de *A. platys* en 4 de las muestras y de *E. canis* en las 4 muestras, demostrando que tanto la estrategia PCR-Secuenciación como la del PCR-RFLP desarrolladas en este trabajo permitieron la identificación especie-específica de estos organismos Rickettsiales y que representan una herramienta muy útil para el diagnóstico diferencial de los organismos Rickettsiales encontrados en Venezuela.

LISTADO DE ABREVIATURAS

EGC: Ehrlichiosis granulocíticas canina

EHG: Ehrlichiosis humana granulocítica

EMC: Ehrlichiosis monocítica canina

Taq: Thermus acuaticus

ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucléico

EDTA: etil dietil triadenosin

pb: pares de bases

µm: micrómetro

seg: segundos

min: minuto

mL: mililitro

ng: nanogramo

mM: milimolar

µM: micromolar

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

$MgCl_2$: cloruro de magnesio

Tm: temperatura de melting

Tf: temperatura de fusión

Kb: kilobases

G: guanina

C: citosina

RO: Rowaldo (Can evaluado)

V: voltios

EMBOSS GUI: European Molecular Biology Open Software Suite

Blast: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las enfermedades Rickettsiales

Las garrapatas transmiten enfermedades que representan un creciente problema de salud pública a nivel mundial. El rastreo de nuevas enfermedades transmitidas por estos artrópodos y de su identidad, ha creado conciencia en las poblaciones de las regiones tropicales y subtropicales acerca de la naturaleza de estas enfermedades zoonóticas. Las más conocidas y frecuentemente diagnosticadas son la encefalitis transmitida por garrapatas, la fiebre Q y la Borreliosis o enfermedad de Lyme. Sin embargo, en la actualidad las enfermedades Rickettsiales ocasionadas por organismos dentro de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, particularmente la Ehrlichiosis Monocitotrópica Canina (EMC) y la Anaplasmosis Trombocitotrópica Cíclica Canina (ATCC), están siendo comúnmente diagnosticadas (Skotarczak, 2003).

1.2. La Rickettsiosis Canina y sus principales vectores

En los canes, los principales agentes causales de la Rickettsiosis son: *Ehrlichia canis*, agente etiológico de la EMC y *Anaplasma platys*, agente etiológico de la ATCC (Iqbal y col., 1994; Dumler y col., 2001; Preziosi y col., 2002; Mavromatis y col., 2006).

E. canis presentan una distribución mundial, principalmente localizada en Norte América, Asia, Sur América y Europa. Esta Rickettsia es una bacteria cuyo ciclo de vida involucra a las garrapatas y es mantenida en la naturaleza por infección persistente de perros salvajes y domésticos (Mavromatis y col, 2006).

A. platys se encuentra distribuida en todo el mundo, incluyendo los Estados Unidos, Grecia, Francia, Taiwan, España, Sur de China, Australia, Tailandia y Venezuela (Dumler y ol., 2001; Huang y col, 2005). Al igual que en el caso de *E. canis*, esta bacteria involucra en su ciclo de vida a las garrapatas.

La EMC y la ATCC son enfermedades cuyo vector es la garrapata marrón del perro *Riphicephalus sanguíneus*, la cuál es considerada un importante ectoparásito en

caninos a través de toda la región del Neotrópico, es también un importante vector de otros patógenos como *Hepatozoon canis* y *Babesia gibsoni* (Venzal y col, 2007). Igualmente es vector de las Rickettsias *E. canis* y *A. platys* en los canes y se ha reportado a la garrapata *R. sanguíneus* como responsable de transmitir la Rickettsiosis a los humanos (Pérez y col, 1996; Oteo y Brouqui, 2005).

Esta garrapata, asociada principalmente a caninos, se encuentra distribuida por todo el territorio nacional. Sin embargo, otra especie de garrapata, la *Amblyomma cajennense* de amplia distribución en áreas rurales del país, pudiera también estar involucrada en la transmisión de la enfermedad, sin embargo aún está siendo investigada su participación como vector de la EMC y la ATCC (Martínez y col, 2008).

Es importante señalar que en Venezuela, la Rickettsiosis canina es originada principalmente por *E. canis* y *A. platys* (Arraga-Alvarado, 1992; Unver y col., 2001; Arraga-Alvarado y col., 2003; Huang y col., 2005; Gil y col., 2008). Estos microorganismos tienen tropismo por células del sistema hematopoyético: monocitos, granulocitos y plaquetas, tanto en perros como en humanos, aspecto que fundamenta la importancia del estudio de estas bacterias zoonóticas (Skotarczak, 2003).

Existen reportes de otros micoorganismos dentro de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, responsables de la Rickettsiosis tanto en perros como en otros hospederos vertebrados a nivel mundial, tales como las especies *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia* ewingii, las cuáles afectan a caninos y humanos y a caninos y felinos respectivamente. *E. ewingii* es una bacteria con tropismo hacia las células granulocíticas y es uno de los agentes causales de la Ehrlichiosis Granulocítica en perros. Por su parte, estudios serológicos indican que la infección por *E. chaffensis* está presente en ciudades de Latinoamérica como Venezuela, Chile, México, Argentina y Brazil (Arraga- Alvarado y col., 1996; Gongora-Bianchi y col, 1999; Ripoll y col, 1999; Da costa y col, 2006), y en Europa, África, Australia y México (Skotarczak, 2003)

En Gran Bretaña, Suiza, Estados Unidos, Bélgica, España, África y el continente asiático puede ser encontrada *Anaplasma phagocytophilum* que afecta a los rumiantes, equinos, bovinos, felinos, caninos y a los humanos. El género *Anaplasma* comprende todas las cepas responsables de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana que se han descrito en todo el mundo (Strick y col, 2007; Greene, 2008). Curiosamente, en la

infección en humanos, esta bacteria presenta tropismo hacia las plaquetas, causando un notorio decrecimiento de las mismas (Oteo y col, 2005). No obstante, en Europa el vector de la EMC es *Ixodes ricinus* (Skotarczak, 2003; Oteo y Brouqui, 2005).

En las regiones tropicales, puede encontrarse el patógeno conocido como *Anaplasma marginale* que es capaz de infectar a los bovinos. Estos organismos pueden ser transmitidos por diferentes géneros de garrapatas tales como: *Dermacentor americanum, Amblyomma cajennense* y *Riphicephalus micropilus* (Iqbal y col., 1994; Dumler y col., 2001; Preziosi y Cohn, 2002; Mavromatis y col., 2006)

En la tabla 1, se muestran de forma resumida los principales vectores de los organismos Rickettsiales, su célula diana y su hospedero vertebrado.

Tabla 1. Vectores responsables de la transmisión de organismos Rickettsiales. Se muestra su hospedero vertebrado y las células sanguíneas que infectan los organismos de los géneros *Ehrlichia y Anaplasma* (Arraga-Alvarado y col., 1992; Oteo y Brouqui, 2005).

	Especie	Cèlula diana	Hospedero	Vector
Ehrlichia	***E. canis***	Monocitos y linfocitos	Caninos y felinos	*R. sanguìneus*
	E. chaffensis	Monocitos y linfocitos	Caninos y Humanos	*A. americanum; D. variabilis*
	E. ewingii	Granulocitos	Canidos y Felinos	*R. sanguìneus; A. americanum; D. variabilis*
Anaplasma	***A. phagocytophilum***	Granulocitos y plaquetas	Rumiantes, Equinos, Bovinos, Felinos, Caninos y Humanos	*I. scapularis; I. ricinus; I. pacificus*
	A. bovis	Monocitos y Linfocitos	Bovinos	*A. americanum; D. variabilis*
	A. platys	Plaquetas	Caninos y Humanos	*R. sanguìneus*
	A. marginale	Eritrocitos	Bovinos	*R. sanguíneus; D. variabilis*

1.3. Taxonomía y características generales de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys.*

Los organismos Rickettsiales *E. canis* y *A. platys* se encuentran dentro de la familia Anaplasmataceae (Dumler y col., 2001; Gajadhar y col., 2010). La familia Anaplasmataceae está formada por organismos intracelulares obligatorios Gram-negativos que parasitan leucocitos, eritrocitos, células endoteliales o plaquetas donde se replican dentro de vacuolas formando agregados intracelulares denominados mórulas. Estos agentes son transmitidos de modo natural a seres humanos y animales domésticos por garrapatas que adquieren las infecciones al alimentarse de sangre de reservorios mamíferos de vida silvestre o animales domésticos (Dumler y col., 2001; Skotarczak, 2003; Mavromatis y col, 2006; Greene, 2008).

Basados en el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, Walker y Dumler en 1996 organizaron las especies del género *Ehrlihia* en tres genogrupos: el genogrupo *E. canis* donde incluyeron a *E. canis, E. chaffeensis, Ehrlichia muris, Ehrlichia ewingii* y *Cowdria ruminantium;* el genogrupo *E. phagocytophilum* constituido por *Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila, E. platys y A. marginale* y el genogrupo *Ehrlichia sennetsu* donde ubican a *E. sennetu, Ehrlichia risticii* y probablemente a *Neorickettsia helminthoeca* (Walker y Dumler, 1996).

Recientemente Dumler y colaboradores en el 2001, realizaron un extenso trabajo donde analizaron datos moleculares y biológicos, proponiendo que todas las especies de las tribus Ehrlichieae y Wolbachieae fueran transferidas a la familia Anaplasmataceae, eliminando las tribus Rickettsiaceae, Ehrlichieae y Wolbachieae. La familia Anaplasmataceae incluye ahora a *A. phagocytophilum, A. equi*, el agente de la EGH, *A. bovis, A. platys* y *A. centrale*. Por su parte el género *Ehrlichia* de esta misma familia, incluye ahora a *E. ruminantium, E. canis, E. muris, E. chaffensis* y *E. ewingii* (Dumler y col, 2001; Skotarczak, 2003).

Dentro de la célula, *E. canis* reside en microcolonias dentro de una vacuola intracelular alineada a la membrana celular, esta aglomeración es denominada mórula, estructura bastante útil en el diagnóstico de estos microorganismos. En el hospedero mamífero, *E. canis* infecta preferentemente monocitos y macrófagos (Simpson, 1974;

Bulla y col, 2004; Oteo y Brouqui, 2005; Mavromatis y col, 2006; Greene, 2008) y está ubicada taxonómicamente como se muestra a continuación:

Reino: Bacteria;

Phylum: Proteobacteria;

Clase: α- Proteobacteria;

Orden: Rickettsiales;

Familia: Anaplasmatacea:

Género: *Ehrlichia*;

Especie: *Ehrlichia canis.*

Por su parte, *A. platys* presenta durante la infección tropismo hacia las plaquetas, mostrando en la fase aguda de infección trombocitopenia cíclica, aunque los perros rara vez muestran severamente afectados por hemorragias (Preziosi y Cohn, 2002; Huang y col, 2005; Greene y col, 2008). Est infección es denominada Anaplasmosis Trombocitotrópica Cíclica Canina (ATCC) (Greene y col, 2008) y está ubicada taxonómicamente como se muestra a continuación:

Reino: Bacteria;

Phylum: Proteobacteria;

Clase: α- Proteobacteria;

Orden: Rickettsiales;

Familia: Anaplasmatacea:

Género: *Anaplasma*;

Especie: *Anaplasma platys.*

1.4. Ciclo biológico de las Rickettsias. Aspectos clínicos y síntomas de la Rickettsiosis Canina

La EMC ocasionada por *E. canis* es una importante enfermedad canina multisistémica que clínicamente se puede presentar en tres fases: la fase aguda, la fase

subclínica y la fase crónica (Skotarczak, 2003; Bulla y col, 2004; Méndez, 2005; Mavromatis y col, 2006; Harrus y Waner, 2011).

Los síntomas más frecuentes, en general, consisten en fiebre alta, anorexia, adelgazamiento, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, trastornos respiratorios y cardíacos, alteraciones nerviosas y oculares, trombocitopenia y leucopenia (Mathew y col., 2000; Harrus y col., 2001; Castro y col., 2004), así como también depresión, hemorragias e hipergammaglobulinemia (Woody y Hoskins, 1991; Harrus y col, 2001).

La patogénesis de la infección de la EMC consiste en un período de incubación de ocho a veinte días, seguido por tres cuadros clínicos diferentes: agudo, sub-clínico y crónico (Harrus y col, 1999), que se caracterizan por los siguientes síntomas:

Agudo: esta fase se inicia de una a tres semanas luego de la picadura de la garrapata infectada y suele durar de dos a cuatro semanas. Puede presentarse fiebre alta, depresión, letargia, anorexia, linfadenomegalia y tendencias hemorrágicas, evidenciándose esplenomegalia. También se pueden presentar petequia, equimosis y epistasis, así como lesiones oftalmológicas que incluyen uveítis y coriorrenitis. En algunos casos se presentan lesiones neurológicas que incluyen meningitis. En este punto el hallazgo clínico más importante es la trombocitopenia, que pude ser de grave a moderada (Mc Bride y col, 2001; Harrus y col, 2011).

Subclínico: durante esta etapa la bacteria se mantienen latente y la infección puede estar presente en el hospedero sin que éste evidencie signos clínicos, hecho que puede mantenerse desde unas cuantas semanas hasta años (Harrus y col, 2011; McBride y col, 2001; Preziosi y Cohn, 2002), no obstante durante esta fase existe la producción de anticuerpos específicos, igualmente, el contaje de células sanguíneas puede verse afectado , especialmente las plaquetas (trombocitopenia, hiperglobulimemia) (Preziosi y Cohn, 2002).

Crónico: no se conoce el progreso de la infección en esta fase, sin embargo una de las manifestaciones más características es la presencia de una exuberante inmunidad humoral aunque ésta no es protectora, es decir, no elimina la bacteria (Preziosi y Cohn, 2002). Sin embargo, en su forma grave, se caracteriza por la reducción de la producción de elementos sanguíneos en la médula ósea, generando así pancitopenia. Puede que los perros que se encuentren en esta fase mueran de forma eventual ya sea por infecciones

secundarias o hemorragias no controlables, es por ello importante detectar la infección Rickettsial antes de que se hag crónico el paciente (Greene, 2008).

La infección Rickettsial generada por *A. platys,* denominada ATCC, presenta signos clínicos similares a la generada por *E. canis*: se observa pérdida de peso, letargia, anorexia, depresión, fiebre, esplenomegalia, lifoadenopatia, epistasis, esquimosis y petequias en la piel y las mucosas. De igual manera, las manifestaciones clínicas presentan tres cuadros clínicos característicos: agudo, subclínico y crónico (Harvey y col, 1978; Greene, 2008).

Dependiendo de la afinidad de las bacterias por las células diana se genera la citopenia observada, ya sea leucopenia y/o trombocitopenia, lo que en algunos casos puede llevar a la inmunodepresión del paciente, facilitando así la aparición de infecciones oportunistas (Oteo y Brouqui, 2005)

El vector artrópodo de estas Rickettsias es la garrapata marrón del perro *R. sanguíneus*. Estas garrapatas entre los huéspedes vertebrados prefieren alimentarse de perros en las tres etapas de su ciclo vital: huevo, ninfa y adulto como se muestra en la figura 1 (Greene, 2008).

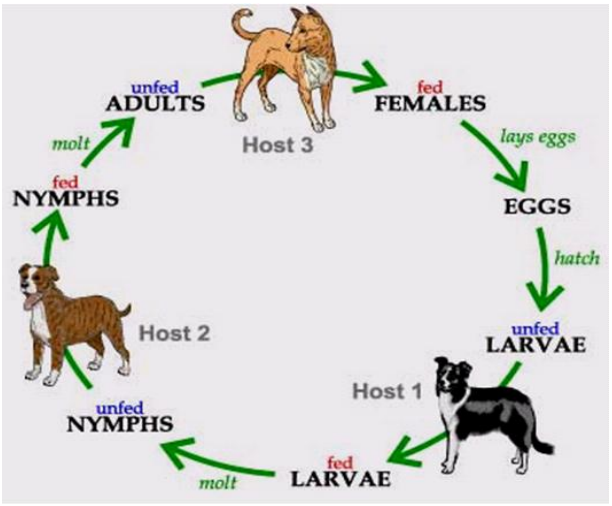


Figura 1. Ciclo infeccioso de la garrapata marrón del perro *R. sanguíneus.* Tomado de http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/ImageLibrary/S-Z/Ticks/body_Ticks_il4.htm.

Considerando el ciclo de vida de estos organismos Rickettsiales desde su entrada al intestino de las garrapatas mediante la ingesta de sangre infectada, las bacterias viajan

del intestino de la garrapata hasta las glándulas salivares del artrópodo. Es en la saliva de la garrapata donde ocurre el desarrollo final del microorganismo Rickettsial (Rojas, 2009). Es importante señalar que la transmisión del organismo Rickettsial al hospedero es transestadial mas no transovárica (Greene, 2008; Rojas, 2009). Una vez que la garrapata infectada pica al perro o al humano, las Rickettsias se introducen al hospedero a través de la saliva y la bacteria es inoculada al hospedador en forma de cuerpo elemental (de 0,5 a 0,9 µm de diámetro). La acción quimiotáctica de las secreciones salivares, atrae a la zona de la picadura a las células inflamatorias factibles de ser infectadas por los patógenos inoculados y puede producir una inmunosupresión local que facilitaría el establecimiento de los patógenos (Méndez, 2005).

En este punto, el microorganismo Rickettsial ingresa al torrente sanguíneo del hospedero en forma de cuerpos elementales; la infección comienza cuando las bacterias penetran a las células sanguíneas diana (granulocitos, monocitos o plaquetas) por fagocitosis o endocitosis. Ya en el interior celular, las Rickettsias inhiben la fusión fagosoma-lisosoma e impiden la apoptosis celular lo que facilita la multiplicación bacteriana por fisión binaria formando así cuerpos iniciales de 1,4 a 2 µm de diámetro. En este punto las bacterias comienzan a aglomerarse en el citoplasma formando inclusiones visibles al microscopio óptico denominadas mórulas, de más de 2 µm de diámetro (Harrus y col, 1999; Oteo y Brouqui, 2005).

Como se puede observar en la figura 2, estas mórulas se disgregan en forma de cuerpos elementales una vez que la célula diana se rompe, e invaden nuevas células hasta instaurar la parasitemia.

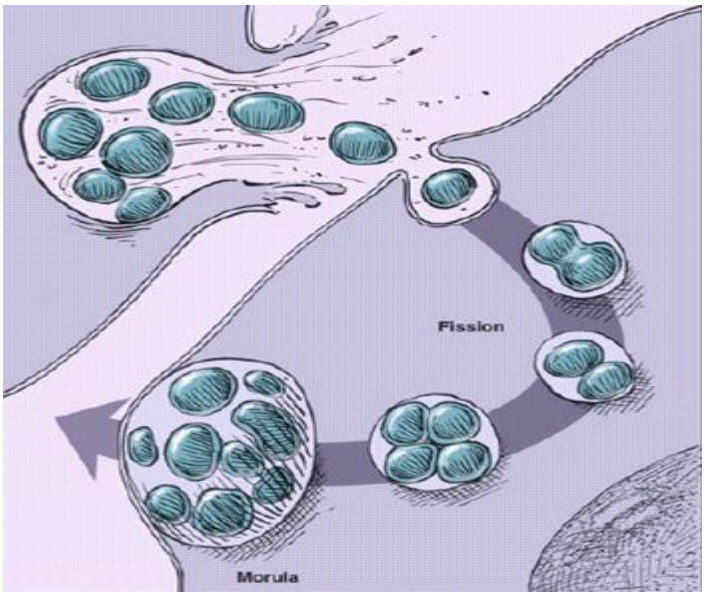


Figura 2. Esquema general de la instauración de la parasitemia del organismo Rickettsial en las células diana (Greene, 2008).

1.5. Diagnóstico de la Rickettsiosis Canina

Tradicionalmente el diagnóstico de la Rickettsiosis incluye la observación de los signos clínicos y las técnicas hematológicas, citológicas y serológicas, las cuales representan instrumentos valiosos para el diagnóstico de la Ehrlichiosis y Anaplasmosis Canina (Inokuma y col, 2001; Greene, 2008; Harrus y col, 2011)

La imposibilidad de obtener cultivos ya que las especies de *Ehrlichia* no crecen en medios de cultivo habituales, sino más bien en líneas celulares específicas como las DH-82, HL-60 y 91HE17 (Dumler y col, 1995; Walker y Dumler, 1996; Mathew y col, 2000; Oteo y Brouqui, 2005) y de la aplicación de técnicas básicas de tinción, limitan la identificación de las infecciones Rickettsiales (Oteo y Brouqui, 2005).

El diagnóstico clínico de la infección por las especies de *Anaplasma y Ehrlichia* se basa en la presencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad como son la leucopenia, trombocitopenia, fiebre, letargia y pérdida de peso, considerando adicionalmente la anamnesis del animal previa posibilidad de contacto con algún vector en áreas endémicas de estos organismos Rickettsiales.

La técnica de laboratorio más empleada para el diagnóstico de estas Rickettsias es el frotis de capa blanca con coloración Romanovsky de sangre periférica del animal

(Simpson, 1974), la cuál permite observar la morfología de las células sanguíneas y la presencia de las mórulas en su interior a través del microscopio óptico. Además, es una técnica cuantitativa apropiada ya que el contaje de plaquetas es económico y seguro para el diagnóstico de la enfermedad en poblaciones de canes en áreas endémicas (Bulla y col., 2004; Lara y col., 2010). Sin embargo no permite diferenciar entre especies ya que las Rickettsias pueden tener una célula diana en común, lo que puede generar inespecificidad en el diagnóstico (Harrus y Waner, 2011). En Venezuela, el frotis de capa blanca con coloración tipo Romanovski es el método de uso rutinario con fines diagnósticos (Gil y col, 2008). Esta es una técnica bastante sencilla y económica, que permite indicar la presencia de las Ehrlichias gracias a que las mórulas que generan en el interior de las células sanguíneas son visibles al microscopio óptico.

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones Rickettsiales requiere de una adecuada selección, obtención y entrega de las muestras. El microorganismo causante de esta infección será mejor detectado durante la fase aguda de la enfermedad ya que en esta fase se encuentra en concentraciones más altas en los fluidos corporales, excreciones, secreciones y sangre (Greene, 2008)

En cuanto a las técnicas serológicas empleadas más comúnmente para el diagnóstico de Rickettsiosis canina, el ensayo de anticuerpos fluorescentes indirecto (IFA) el método más ampliamente utilizado (Kakoma y col., 1994; Dawson y col., 1996a; When y col., 1997; Bélanger y col., 2002). Es importante señalar que *A. platys* no muestra reactividad antigénica cruzada con *E. canis*, aunque si se han reportado infecciones mixtas con ambas Rickettsias (Breitschwerdt y col, 1998; Preziosi y Cohn, 2002). La infección mixta con *E. canis* y *E. ewingii* ha sido igualmente reportada asociada a epistaxis, aunque es poco fatal en los canes (Preziosi y Cohn, 2002).

En Venezuela, esta técnica del IFA también se ha empleado en el diagnóstico de la Anaplasmosis causada por *A. platys* tanto en perros como en humanos, donde se obtienen "frotis antígenos" los cuáles permiten detectar la presencia de anticuerpos específicos contra esta Rickettsia en sueros de canes con signos clínicos de presentar la infección Rickettsial (Arraga-Alvarado y col., 1997).

El ELISA indirecto, el Western Blot y estuches comerciales como el Snap 4Dx, Snap 3Dx (IDEXX) son metodologías disponibles para el diagnostico serológico (Iqbal

y col., 1994; Kakoma y col., 1994; Rikihisa y col., 1994; Hoskins, 2000; Bélanger y col., 2002), siendo estas últimas las más empleadas en Venezuela por las clínicas veterinarias.

El ciclo de vida intracelular obligado de las Rickettsias además del pequeño número de organismos presentes en muestras clínicas, así como la reacción serológica cruzada entre especies, pueden dificultar el diagnóstico y la identificación a nivel de especie de los organismos Rickettsiales (Jado y col, 2006). El contaje de plaquetas y la serología son buenas técnicas de análisis de laboratorio para el diagnóstico de la Rickettsiosis Canina aunque poco sensibles, lo que requiere que sean usadas en conjunto a otras técnicas de diagnóstico.

Debido a todas estas dificultades, un diagnóstico definitivo de la infección con algún organismo Rickettsial requiere técnicas moleculares (Inokuma y col, 2001; Harrus y col, 2011), como es el caso de la PCR y la secuenciación, ambas pruebas de confirmación definitivas para determinar la presencia de *Ehrlichia* o *Anaplasma* (Inokuma y col, 2001; Jado y col, 2006; Bulla y col, 2004; Harrus y col, 2011).

Desde los años 90, los ensayos de PCR basados en el gen ARNr 16S y en genes codificando proteínas han sido ampliamente utilizados para diagnostico de Rickettsias y para análisis de filogenia (Raoult y Roux, 1997; Pusterla y col., 1998; Hancock y col., 2001; Rodicio y Mendoza, 2004; Lee y col., 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa denominada en sus siglas en inglés PCR, es una técnica cuyo principal analito es el ADN. Este ensayo depende de la correcta extracción del ADN de una muestra sanguínea permitiendo de esta manera generar un templado adecuado para el ensayo. La técnica permite, mediante el empleo de unos cebadores específicos y una ADN polimerasa (*Taq* polimerasa termoresistente), la replicación *in vitro* de millones de copias de ADN a partir de una pequeña cantidad de ADN molde, el cual es amplificado en poco tiempo, mediante el empleo de un termociclador (Harris, 1998; Sánchez y Saldaña, 2004; McPearson y Møller, 2006). Se ha demostrado que es un método altamente sensible y específico para detectar la infección por *E. canis* o *A. platys* en perros (Greene, 2008).

Distintos blancos moleculares son usados para el diagnóstico por PCR de las Rickettsias (Massung y Slater, 2003). Los ensayos de PCR basados en los genes ARNr

16S (Kakoma y col, 1994; Hancock y col, 2001; Parola y col, 2003; Huang y col, 2005; Beall y col., 2008; Macieira y col., 2005; Oteo y Brouqui, 2005), del operón *groESL* (Lee y col, 2003; Huang y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005), en la proteína p30 (Stich y col, 2002) y el gen de la citrato sintasa (*gltA*) (Inokuma y col, 2001; Inokuma y col, 2002; Parola y col, 2003), son los más utilizados para la detección de la infección con organismos Rickettsiales. De estos ensayos, el PCR basado en el gen ARNr 16S, reflejado en una base de datos más amplia con respecto a los demás genes para organismos Rickettsiales, es considerado el mejor blanco molecular para realizar ensayos de diagnóstico e identificación de Rickettsias (Raoult y Roux, 1997; Klappenbach y col, 2001; Parola y col, 2003: Rodicio y Mendoza, 2004; Huang y col, 2005; Macieira y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005; Cuadra [Consulta: 16 de Enero de 2012]). Sin embargo, se ha reportado que el PCR-anidado del gen para la proteína p30 es más sensible que el PCR-anidado del gen ARN ribosomal 16S (Stich y col, 2002; Harrus y col, 2011).

Diversas modificaciones del ensayo PCR convencional han sido utilizadas por diversos autores para la detección de microorganismos Rickettsiales, con la finalidad de incrementar la sensibilidad, aumentar la especificidad a nivel de especie y facilitar la detección del resultado. De esta forma tenemos los siguientes ensayos:

- El PCR-BP (PCR-Biotilinated Primer), en el cuál es usado un solo par de cebadores, uno de los cuáles es marcado con biotina, aumentando la especificidad del ensayo (Mathew y col, 2000)

- El PCR-CH (PCR-Chemiluminiscent Hibridization) en el cuál un cebador interno complementario cumple la función de sonda. El mismo está unido covalentemente a la enzima peroxidasa de rábano, lo que permite que luego de la hibridación, pueda observarse el producto de amplificación mediante un sustrato quimioluminiscente y la exposición a partículas de rayos X. Lo señalan como una técnica complementaria de diagnóstico (McBride y col, 1996).

- El PCR-anidado (PCR-nested), en el cuál se utilizan secuencialmente dos pares de cebadores, un par género-específico y un par especie-específico, que permiten, mediante dos rondas de amplificación, el diagnóstico especie específico de los organismos Rickettsiales. La segunda ronda de amplificación

trabaja sobre los fragmentos obtenidos en la primera ronda de amplificación (Dawson y col, 1996b; When y col, 1997; Stich y col., 2002; Oteo y Brouqui, 2005; Gil y col,2008; Beall y col, 2008)

- El PCR de transcriptasa inversa. Esta variante de amplificación cíclica detecta ARN (ARNm o ARNr), mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa que utiliza un ADN complementario (ADNc), posteriormente utilizado como templado para la reacción de PCR, siendo una técnica adecuada para detección de ARN de virus y de organismos de cualquier agente infeccioso, incluyendo los Rickettsiales (Felek y col., 2001; Greene, 2008).

- El PCR-RT (PCR-Real Time). En el PCR en tiempo real en sus diferentes variantes, se emplea alternativamente una sonda que incluye un oligonucleótido marcado con un fluoroforo que se hibrida con el amplicón obtenido, lo que permite detectar de forma simultánea y diferencial las especies Rickettsiales por análisis de curvas de desnaturalización (melting curve analysis) (Bell y Patel, 2005; Peleg y col., 2010).

- PCR multiplex, que es una técnica que permite amplificar varios blancos moleculares en una sola ronda de PCR mediante el empleo de varios pares de cebadores en la mezcla de reacción. Presenta como ventaja que es rápida, económica y sencilla, y no afecta la calidad de los amplicones obtenidos (Luque y Herráez, 2006).

- El PCR- RFLP por sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Longitud en Fragmentos de Restricción), el cual se basa en la diferencia nucleotídica en el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción en amplicones obtenidos mediante el ensayo PCR, que genere patrones de corte diferentes, los cuáles permiten discernir entre especies de organismos Rickettsiales, facilitando su diagnóstico (Dawson y col, 1996b; Inokuma y col, 2001; McPherson y Møller, 2006).

En Venezuela, la técnica reportada de diagnóstico molecular es el PCR-anidado del gen ARNr 16S (Arraga-Alvarado y col., 1996; Huang y col., 2005 y Gil y col., 2008), el cuál permite hacer un diagnóstico especie-específico de estas importantes bacterias zoonóticas de interés clínico y veterinario (Yu y col., 2006; Gil y col., 2008).

1.6. Tratamiento de la infección Rickettsial Canina

En el tratamiento de la Ehrlichiosis se utilizan diversas drogas como la tetraciclina, el cloranfenicol, el dipropionato de imidocarb y la amidocarbalida. En general, mientras más rápido se inicie el tratamiento durante el progreso de la infección, más favorable será el pronóstico y los resultados (Greene, 2008).

En el pasado, la tetraciclina y la oxitetraciclina eran las drogas más empleadas por ser consideradas los mejores fármacos, sin embargo, actualmente la oxiciclina y la minociclina son más frecuentemente utilizadas (Neer y col, 2002), siendo la terapia con Doxiciclina considerada como el estándar de oro en el tratamiento de la Ehrlichiosis canina. Se ha documentado que con esta droga disminuyen los signos clínicos y las anormalidades clinopatológicas en perros infectados (Eddlestone y col, 2007). La dosis recomendada de oxiciclina es de 10 mg/Kg cada 24 horas durante 4 semanas (28 días) para una infección natural (Neer y col, 2002). McClure y colaboradores (2010) señalan que el tratamiento durante la fase aguda y subclínica de la infección es bastante efectivo, sin embargo pierde eficacia durante la fase crónica.

Es importante señalar, que en perros que presentan infecciones persistentes aún luego de haber cumplido un tratamiento con tetraciclinas o en cachorros menores de 5 meses, el tratamiento con el cloranfenicol es el más recomendado (Greene, 2008).

Por su parte, el tratamiento con dipropionato de imidocarb ha sido demostrado como un efectivo tratamiento contra la Ehrlichiosis Canina cuando es administrada en dosis de 5mg/Kg durante 15 días, sin embargo, el contaje plaquetario que sufre una disminución durante la infección Rickettsial como consecuencia de la lisis de estas células trombocítticas, es aún bajo en comparación al contaje plaquetario en un canino tratado con oxiciclina (Neer y col, 2002).

Por último, la enrofloxacina (quinolona) se ha mostrado bastante efectiva en el tratamiento de otras enfermedades Rickettsiales como la fiebre de las montañas rocosas, sin embargo, se ha demostrado que no es efectiva contra infecciones experimentales con *E. canis*, por lo que es poco usada en perros (Greene, 2008).

En este sentido, vemos que existen diversas drogas disponibles en el mercado para el tratamiento de la Ehrlichiosis canina, siendo unas más efectivas que otras, sin embargo, la de mayor uso en la actualidad es la oxiciclina. Esto se debe a que esta

droga derivada de las tetraciclinas presenta una modificación de la estructura de las tetraciclinas, con un incremento en la habilidad para penetrar membranas biológicas, característica que la diferencia de otros antibióticos que no son capaces de penetrar éstas barreras. La oxiciclina es efectiva en el tratamiento de diversas infecciones como por ejemplo: infecciones respiratorias, abscesos e infecciones prostáticas, y tiene la capacidad de penetrar las células y llegar a parásitos intracelulares. Es un bacteriostático y su efecto antimicrobiano se debe a que inhibe la síntesis de proteínas. Es activa contra una amplia gama de bacterias tanto grampositivas y gramnegativas.

Esta droga derivada de la oxitetraciclina, presenta el más alto grado de liposolubilidad entre todas las tetraciclinas, penetrando de forma directa por transporte activo y por difusión pasiva la doble membrana lipídica de los agentes infecciosos. La droga se une a un receptor específico en la subunidad ribosomal 30S, bloqueando la unión del ARNm y ARNt, lo cual impide la correcta síntesis proteica de los microorganismos, atacando incluso algunas cepas resistentes a otras tetraciclinas.

Adicionalmente, esta droga presenta un alto grado de unión a las proteínas plasmáticas del plasma, lo que le permite permanecer mayor tiempo en el organismo del perro tratado y por ende tener una mayor eficacia, por lo que son consideradas de larga acción.

2. ANTECEDENTES

La primera infección Ehrlichial reconocida como una enfermedad aislada en canes data del año 1935 en Algeria, descrita por Donatien y Lestoquard (Greene, 2008; Gil y col., 2008), y desde entonces ha sido reconocida en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Preziosi y Cohn, 2002; Castro y col, 2004), incluyendo los Estados unidos, Europa, Sur América y Asia (Mavromatis y col, 2006). En los Estados Unidos de Norteamérica la Ehrlichiosis fue reportada por primera vez en 1963, y fue reconocido como patógeno de importancia veterinaria luego de infecciones en perros de la milicia en Vietnam, donde ocasiono la muerte de más de 200 perros (Skotarczak, 2003; Mavromatis y col, 2006).

Desde entonces, los organismos Rickettsiales han sido objeto de estudios rigurosos, a fin de permitir un adecuado diagnóstico de la enfermedad e identificación a nivel de especies, dentro de los que se incluyen la observación de los síntomas clínicos, técnicas hematológicas, técnicas serológicas y técnicas moleculares.

Las técnicas hematológicas representan una importante herramienta en el diagnóstico de estas enfermedades por su bajo costo y su practicidad, sin embargo, no permite una identificación clara de los organismos Rickettsiales ya que estos presentan dificultad en cuanto a la tinción, por lo que pueden haber fallas en este tipo de metodologías.

Las técnicas serológicas también son bastante efectivas en el diagnóstico de las enfermedades Rickettsiales y presentan un alto grado de sensibilidad. Dentro de estas técnicas las más empleadas son el IFA, el ELISA, el Western Blot y los SNAP`s (Harrus y Waner, 2011). Un estudio comparativo sobre la sensibilidad de diferentes métodos serológicos utilizando como referencia el IFA para la detección de *E. canis* en caninos, fue relizado por Bélanger y colaboradores en el 2002. Estos autores compararon la sensibilidad de los ensayos rMAP2 ELISA, Snap3Dx, Dip-S-Ticks y Snap Combo Canino, teniendo como resultados una sensibilidad del 97%, 89,8%, 85,1% y 82,9% respectivamente. Sin embargo, estos métodos dejan de ser efectivos cuando ocurran infecciones mixtas. Así mismo las Rickettsias son bacterias difíciles de

cultivar, y crecen en líneas celulares específicas y muy costosas, lo que dificulta la disponibilidad del antígeno para los ensayos serológicos.

Finalmente, se encuentran las técnicas moleculares, siendo estas últimas las más empleadas de estas metodologías por la alta sensibilidad y especificidad, superando las dificultades de la tinción y del cultivo (Inokuma y col., 2001; Oteo y Brouqui, 2005; Greene, 2008; Harrus y col, 2011). Dentro de los ensayos moleculares, la PCR es la técnica que ha sido usada más ampliamente por diversos autores gracias a su practicidad, incluyendo la amplia evaluación de diversas modificaciones de este ensayo y la escogencia de diversos blancos moleculares.

Iqbal y col en 1994 compararon la sensibilidad del ensayo PCR convencional con el reaislamiento de cultivos celulares de *E. canis*, el IFA y el Western Blot, como técnicas de diagnóstico de la Ehrlichiosis Canina. Para ello inocularon 5 perros de raza Pastores Alemanes con células DH82 infectadas con *E. canis*. Tomaron muestras interdiarias de sangre durante 2 semanas, tomando la fracción de células mononucleares para el reaislamiento, ADN para llevar a cabo el ensayo PCR en base al gen ARNr 16S, y plasma para ensayos en base a la presencia de anticuerpos contra *E. canis.* Mediante el ensayo PCR, amplificaron una banda de 600 pb del gen ARNr 16S de *E. canis*, empleando los cebadores A17 y EC3, detectada entre los 4 y 10 días postinfección. *E. canis* pudo ser reaislada de los 5 canes a partir del segundo día postinfección. Los ensayos de IFA y el Western Blot pudieron detectar anticuerpos contra *E.canis* entre los 2 y 8 días postinfección. Concluyeron que el PCR, en conjunto con la IFA, representan una poderosa herramienta en el diagnóstico de la Ehrlichiosis Canina y que el reaislamiento de cultivo de células provee una mayor sensibilidad para el diagnóstico de la Ehrlichiosis, aunque no es conveniente durante tiempos de infección muy largos.

Chang y Pan en 1996, desarrollaron un PCR-anidado, como método de diagnóstico de la infección canina trombocitotrópica cíclica. Emplearon tres cebadores en base al gen ARNr 16S para amplificar ADN del genoma de *A. platys*, denominados EP1, EP2 y EP3. Las dos rondas de amplificación con el templado de ADN extraído de células plaquetarias infectadas con *A. platys* arrojaron bandas de amplificación de 742pb (cebadores EP1-EP3) y 385pb (EP2-EP3), ausentes en los controles empleados de *E. canis* y *E. coli*. Este estudio demostró que este ensayo es más sensible y específico en comparación al PCR convencional en la detección del agente etiológico de la ATCC. La

utilización del ensayo en muestras sanguíneas de especímenes inoculados con *A. platys* permitió observar las bandas de amplificación al usar como blanco el ADN extraído de estas muestras quince días postinoculación, demostrando que este método es también aplicable en infecciones recientes con este organismo Rickettsial.

En 1996 Dawson y colaboradores (Dawson y col., 1996b) desarrollaron un ensayo PCR-anidado en base al gen ARNr 16S para determinar la presencia de ADN de *E. chaffensis* en 10 ciervos de cola blanca en Oklahoma-Georgia. Los autores aislaron ADN de las muestras sanguíneas y empleando los cebadores genéricos 8F y 1448R y los cebadores especie-específicos 15F y 1442R, amplificaron una región de 1357pb. El PCR anidado fue comparado con un análisis de restricción (PCR-RFLP) empleando las enzimas *Ava*I, *Ava*II y *Rsa*I, seguido de la secuenciación de los amplicones obtenidos. Este estudio reveló la presencia de un único agente infectando las 10 muestras sanguíneas muestreadas.

En el año 2001, Inokuma y colaboradores emplearon el análisis de restricción (PCR-RFLP) dirigido al gen de la citrato sintasa (*gltA*) para la detección de organismos Rickettsiales, esta vez, los transmitidos por la garrapata marrón del perro *R. sanguineus*. Utilizando los cebadores EHR-CS136F y EHR-CS778R para amplificar el ADN de organismos del género *Ehrlichia*, y los cebadores NEO-CS142F y NEO-CS730R para amplificar ADN de organismos del género *Neorickettia* y las enzimas *AcsI* y *XhoI* sobre los amplicones obtenidos. Estos autores concluyeron que los patrones de restricción obtenidos permitieron identificar de forma específica a los organismos del genogrupo *Neorickettsia* y del género *Ehrlichia*, confirmando que esta técnica podría ser utilizada para la rápida identificación de especies de *Ehrlichia*.

Por otra parte, en España en el año 2004 realizaron el primer aislamiento, cultivo y caracterización molecular de *E. canis*, de perros infectados naturalmente usando la línea celular DH82. El ensayo PCR-anidado en base al gen ARNr 16S generó una banda de 1412pb. La amplificación de 1412 pb del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos ECC y ECB y los especie-específicos HE-3 y ECA y la posterior secuenciación del producto permitió identificar una nueva cepa de *E. canis* en el análisis comparativo con las secuencias del gen ARNr 16S de otras cepas de *Ehrlichia* disponibles en la base de datos del GenBank. El alto grado de similaridad entre la nueva

secuencia de *E. canis* y las ya reportadas, sobre todo con las cepas de Japón, Venezuela e Israel, les permitió concluir que *E. canis* se encuentra en España (Aguirre y col, 2004).

En Brasil, se han realizado estudios sobre la prevalencia de *E. canis* en caninos trombocitopenicos mediante el ensayo de PCR-anidado contra el gen ARNr 16S de las Rickettsias empleando un par de cebadores genéricos para organismos Rickettsiales de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* y un par de cebadores *E. canis*- específicos, con un total de 226 muestras. Los perros sujetos a estudio fueron agrupados como trombocitopenicos y no trombocitopenicos. Evaluaron la existencia de una diferencia en la prevalencia de *E. canis* en estos grupos, donde el 32,1% (n=36) de los canes trombocitopenicos analizados fueron positivos y 3,5% (n=4) de los canes no trombocitopenicos fueron positivos con el par de cebadores genéricos, mientras que el 26,8% (n=30) de los canes de los perros trombocitopénicos y 3,5% (n=4) de los no trombocitopénicos fueron positivos con el par de cebadores *E. canis*-específicos, sugiriendo este estudio, que la prevalencia de *E. canis* es mayor en los canes trombocitopénicos. A menos de un tercio de estos perros les fue diagnosticada la infección con *E. canis.* De esta forma, la trombocitopenia no es específica como síntoma para la detección de la infección con *E. canis* y no puede ser usada sola para establecer un diagnóstico de Ehrlichiosis Canina, aún en un área geográfica con relativa alta incidencia de la enfermedad (Macieira y col, 2005).

En el 2011, Harrus y Waner realizaron una revisión de todas las técnicas empleadas en el diagnósctico de la Ehrlichiosis, concluyendo que el diagnóstico puede ser hecho en base a signos clínicos y por pruebas de laboratorio, pero que la co-infección con otros patógenos de garrapatas puede influenciar los signos clínicos y de laboratorio, complicando el diagnóstico de las Rickettsias. Igualmente, manifestaron que el contaje de plaquetas y la serología son buenas técnicas de diagnóstico en el laboratorio, sin embargo, resaltaron que las técnicas moleculares de PCR en base a diversos blancos moleculares: *p30*, *p28*, ARNr 16, *Vir*B9 y la secuenciación son las pruebas confirmatorias definitivas de la infección con *E. canis* y *A. platys*, siendo el PCR- nested y el PCR-RT mas sensibles que el PCR convencional. Igualmente, señalaron que la secuenciación es importante para evitar diagnosticar falsos positivos.

Un aspecto importante en señalar, es que estas Rickettsias no sólo presentan como hospedero a los perros, sino que desde los años 50, ha habido reportes de la infección por Rickettsias en humanos, convirtiéndola en una infección de carácter antropozoonótico.

La primera información de una infección con Ehrlichiosis humana data del año 1953 (Oteo y Brouqui, 2005). Sin embargo, fue a mediados de 1980 cuando una especie Ehrlichial fue reconocida como la causante de la enfermedad en humanos en los Estados Unidos de Norteamérica. Desde entónces, otras especies de Ehrlichia han sido encontradas en infecciones humanas, hecho que ha evidenciado la Ehrlichiosis como una enfermedad zoonótica, conociéndose que algunas especies que infectan inicialmente perros pueden infectar humanos, a través de la garrapata dura marrón del perro *R. sanguíneus* (Preziosi y Cohn, 2002; Stone y col, 2007). Igualmente existen reportes de la prevalencia de *E. chaffensis* como agente etiológico en la infección Rickettsial en humanos en países como México, Italia, Argentina, Perú, Chile y Japón (Góngora y col, 1999; Nuti y col, 1998; Ripoll y col, 1999; Abarca y col., 2008; Anaya y col., 2009; López y col, 2003; Kawahara y col, 2009). En los Estados Unidos de Norteamérica la primera infección con EGH diagnosticada se evidenció en el año 1986 en un individuo de 51 años con signos clínicos similares a la Fiebre Manchada de las Montaña Rocosas. El individuo presentó fiebre, dolor de cabeza y náuseas, identificándose microcolonias denominadas mórulas de *Ehrlichia* en el citoplasma de las células monocíticas de la muestra sanguínea del individuo, además, se confirmó la asociación con exposición a garrapatas (Maeda y col, 1987).

En 1991, Anderson y colaboradores emplearon el ensayo PCR convencional con una modificación de los cebadores universales P3mod y PC5 dnominados EC9/EC10 y EC11/EC12, dirigido al gen ARNr 16S en muestras sanguíneas de dos pacientes humanos que luego fueron clonadas y secuenciadas, dos cepas de *E. canis*, una cepa de *E. equi*, dos cepas de *E. phagocitophila* y dos cepas de *E. senettsu*, amplificando una región de 733 pb y 765 pb con cada par de cebadores respectivamente. Estas secuencias fueron comparadas con una secuencia previamente publicada de *E. risticii*. Como resultdo, las secuencias del gen ARNr 16S de los humanos fueron idénticas a las secuencias de los agentes causales de Ehrlichiosis en humanos que además, están

estrechamente relacionados con *E. canis* (98,2%) mas que con el resto de las Ehrlichias. Esta nueva especie la denominaron *E. chaffensis*.

En 1994, Chen y colaboradores empleando el ensayo descrito por Anderson y colaboradores en 1991, identificaron una especie Ehrlichial granulocítica no conocida, como el agente etiológico responsable de la Ehrlichiosis en humanos. Para ello evaluaron 6 pacientes humanos mediante el ensayo PCR convencional y obtuvieron productos de amplificación de 1500 pb, con el empleo de los cebadores universales para Eubacterias POmod y PC5 dirigidos al gen ARNr 16S en las muestras de los pacientes y en un cultivo de *E. chaffensis* en células DH82. El análisis de la secuencia nucleotídica del producto de amplificación reveló un 99,9 % y 99,8 % de similaridad con *E. phagocytophilum* y *E. equi* respectivamente, ninguna previamente conocida como patógeno humano. Posteriormente, realizaron un PCR-anidado usando una modificación de los cebadores universales POmod y PC5, denominados EC9, EC10 y EC12, y obtuvieron una banda de amplificación de 1500 pb sólo en 4 pacientes usando el par de cebadores EC9 y EC12. Sin embargo, con los cebadores EC9 y EC10 hubo una banda de amplificación de 766 pb del gen ARNr 16S de todos los pacientes del ensayo. Al usar los cebadores *E. chaffensis*-específicos HE1 y HE3 no hubo amplificación del gen ARNr 16S. Sin embargo, al usar los cebadores especie-específicos GE9f y GE10r dirigido al gen del ARNr 16S del agente de la EHG se observó una banda de amplificación de 919 pb para 4 de los 6 pacientes. Al usar los cebadores GE10r y EC10 se obtuvo una banda de amplificación de 234 pb para los 6 pacientes del ensayo. Estos resultados en conjunto a la secuenciación de los amplicones obtenidos del gen ARNr 16S de las Eubacterias, demostraron la existencia de una enfermedad infecciosa Ehrlichial en humanos no conocida previamente.

Bell y colaboradores en el 2005 desarrollaron un ensayo PCR-RT que permitió detectar simultáneamente y diferenciar *A. phagocytophilum*, *E. chaffensis* y *E. ewingii*, cuyo blanco molecular es el gen del operón de la proteína de choque térmico *groESL*. Analizaron la coincidencia entre los nucleótidos amplificados con sondas de hibridación y diferenciaron a los microorganismos antes mencionados mediante el análisis de curvas "melting". Para ello tomaron muestras de 59 organismos previamente positivos para *A. phagocytophilum* (n=37), *E. chaffensis* (n=19) y *E. ewingii* (n=3), los cuáles fueron usados para evaluar el ensayo. Todos los especímenes positivos para uno de los tres

organismos por PCR convencional fueron positivos igualmente por el método del PCR-RT. De esta forma concluyeron, que la especificidad y sensibilidad de este ensayo PCR-RT es del 100% en comparación al PCR convencional, además de que este ensayo provee un método más rápido para la detección y diferenciación del agente causal de la Ehrlichiosis en humanos en los Estados Unidos de Norteamérica.

En Venezuela han surgido reportes de Ehrlichiosis Canina generada por *E. canis* en Maracaibo, estado Zulia, los cuales comenzaron a aparecer en el año 1982 (Arraga-Alvarado y col, 1992). En esta ciudad, 55 casos de Erlichiosis han sido diagnosticados en la Universidad del Zulia, mediante el frotis sanguíneo con coloración Giemsa.

Sin embargo, hay reportes que confirman un caso previo de EMC en una niña de 17 meses de edad demostrado serológicamente por Arraga-Alvarado y col, 1996. La niña presentó inicialmente sintomatología compatible con una virosis, progresando con exantema, complicaciones pulmonares, hepáticas, esplénicas, renales y hematológicas incluyendo pancitopenia y coagulación intravascular diseminada. Diferentes diagnósticos fueron planteados antes de concluir que se trataba de una Ehrlichiosis. El diagnóstico inicial fue realizado usando frotis de capa blanca teñido con Diff Quick Stain. La presencia de anticuerpos específicos contra *E. chaffeensis* fue demostrada utilizando la técnica IFA. Estos hallazgos en humanos no se habían descrito con anterioridad en el país.

Más tarde, en 1997, Arraga-Alvarado y colaboradores, emplearon la técnica de IFA para la detección de la Rickettsiosis Canina, donde además de desarrollar la técnica con sueros de perros, usaron sueros de humanos para determinar la presencia de una infección Rickettsial con *A.* platys. Procesaron 30 muestras de sueros de caninos y 30 muestras de sueros de humanos positivos por frotis de capa blanca a la presencia de Ehrlichias en las células mononucleares, donde el 16,6% de los canes fueron positivos por esta prueba mientras que ningún humano resulto positivo.

En el 2003, Arraga-Alvarado y colaboradores hicieron un estudio ultraestructural de infecciones naturales y experimentales con *A. platys.* Los autores inocularon 3 perros con una cepa de *A. platys.* Cuando la parasitemia estuvo entre los 60% y 97%, las muestras de sangre obtenidas de los perros inoculados y los infectados naturalmente fueron centrifugadas para obtener el plasma rico en plaquetas, fijaron los

pellets plaquetarios con glutaraldehído y luego los procesaron para poder ser vistas en un microscopio electrónico de transmisión convencional. De esta forma observaron en ambos grupos de estudio organismos pleomórficos, con una doble membrana distintiva dentro de vacuolas citoplasmáticas en el interior de las células plaquetarias. Otros resultados concluyentes de este estudio indican es que existen características ultraestructurales distintivas asociadas a los diferentes estados del desarrollo de *A. platys*, y puede diferir entre las cepas de este microorganismo.

Adicionalmente, en estudios realizados por Huang y colaboradores en el 2005 en Venezuela, se confirmó la presencia de una cepa de *A. platys* mediante el desarrollo de un estudio de la prevalencia de *A. platys* en canes del estado Lara, empleando el ensayo PCR-anidado seguido de la secuenciación de los productos de amplificación. Para ello, evaluaron 43 canes y el 16% (7 canes) fueron positivos para la infección con dicha Rickettsia, mientras que 25 canes fueron negativos para la infección. Evaluaron también la secuencia entera del gen ARNr 16S (1364pb) y del gen *groESL* (1646pb) aislados de los perros infectados, encontrando que ambas secuencias están estrechamente relacionadas con una cepa de *A. platys* encontrada en la garrapata *R. sanguíneus* en la República del Congo. Igualmente evaluaron las muestras de ADN de 10 garrapatas que extrajeron de los mismos canes, las cuáles fueron negativas por PCR de transcriptasa reversa dirigido al gen ARNr 16S (Huang y col., 2005).

Más tarde, Martinez y colaboradores en el 2008 confirmaron que en diciembre de 2001 un niño de 9 años de edad se registró en un hospital de Carabobo con síntomas de Ehrlichiosis, que incluía lesiones cutáneas por exposición a garrapatas en un área endémica, mostrando así luego de estudios serológicos realizados que incluían la IFA, y de pruebas moleculares que incluían el PCR del gen ARN ribosomal 16S y la secuenciación, demostrando que existe evidencia molecular de la infección de *E. chaffensis* en un paciente en Venezuela (Martínez y col, 2008).

Gil y colaboradores en el 2008, identificaron mediante PCR-anidado especies Ehrlichiales observadas en frotis en capa blanca en células mononucleares. Tomaron la muestra sanguínea de 12 canes y realizaron frotis en capa blanca, en todos los frotis observaron mórulas características de *E. canis* y *E. chaffensi*. Al realizar el PCR usando los cebadores genéricos ECB y ECC (amplifican 483pb del ADN de todas las especies del género *Ehrlichia* y *Anaplasma* y de otras especies bacterianas como *E. coli* 518pb) y

los especie- específicos “canis” y HE3 para *E. canis* y HE1 y HE3 para *E. chaffensis* (ambos amplifican 388pb), todas las muestras presentaron una banda de amplificación correspondiente a 388pb para *E. canis*, mientras que sólo 4 canes fueron positivos para *E. chaffensis.* De esta forma demostraron la existencia de una coinfección con ambas especies, siendo el estudio pionero en Venezuela y Suramérica en el que se reportan un número significativo de perros infectados con *E. chaffensis*, el agente etiológico de la Ehrlichiosis en humanos.

Estos estudios revelan la importancia del desarrollo de técnicas rápidas, sencillas y económicas para el estudio de estas Rickettsias que afectan tanto a los perros como a los humanos, considerando que Venezuela es un país donde hay gran cantidad de canes que integran los grupos familiares en calidad de mascotas. El entendimiento de los mecanismos de la patogénesis de esta enfermedad antropozoonótica, así como un temprano y adecuado diagnóstico de la misma, permitirá proveer un apropiado tratamiento a los pacientes en caso de infección Rickettsial, igualmente, incrementará el grado de conocimiento en la población acerca de esta enfermedad antropozoonótica.

Es por ello, que uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar un ensayo PCR dirigido al gen ARNr 16S, con cebadores capaces de amplificar la región variable del gen o el gen completo, para permitir el diagnóstico especie-específico de las Rickettsias, en conjunto con la secuenciación como prueba confirmatoria. Adicionalmente, otro de los objetivos planteados es desarrollar un ensayo PCR-RFLP para detectar la presencia de organismos Rickettsiales en caninos de forma rápida y sencilla, obviando una segunda ronda de amplificación por PCR. Nuestro aporte representa un gran avance en cuanto al diagnóstico e identificación molecular de Rckettsias en el país.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Identificar molecularmente organismos Rickettsiales en caninos de diferentes regiones de Venezuela.

Objetivos específicos:

1. Analizar *in sílico* las secuencias reportadas del gen ARN ribosomal 16S de organismos Rickettsiales que infecten caninos, a fin de seleccionar de los ensayos de PCR reportados en la literatura, un conjunto de cebadores género y especie específicos basados en el gen del ARN ribosomal 16S.

2. Normalizar las condiciones del ensayo de PCR basado en el gen ARN ribosomal 16S.

3. Determinar molecularmente mediante el ensayo de PCR seleccionado, la presencia de organismos Rickettsiales en muestras sanguíneas de caninos de diferentes regiones de Venezuela.

4. Identificar a nivel de especie por secuenciación las muestras positivas a organismos Rickettsiales mediante el ensayo PCR del gen ARNr 16S seleccionado.

5. Analizar comparativamente las secuencias de organismos Rickettsiales obtenidas a partir de muestras sanguíneas de caninos de diferentes regiones de Venezuela entre sí y con las reportadas en el GenBank.

6. Analizar las secuencias reportadas para el gen del ARNr 16S en el GenBank de organismos Rickettsiales y el grado de identidad entre *A. platys y E. canis*, para conocer los polimorfismos existentes y su potencial uso en un ensayo PCR-RFLP.

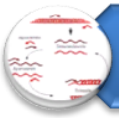
4. MATERIALES Y MÉTODOS

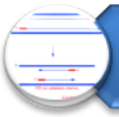
Esquema general de la metodología empleada

Obtención de muestras.

Extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre de canes positivos a la infección por Rickettsias, por sintomatología clínica y exámen parasitológico.

Cuantificación de ADN.

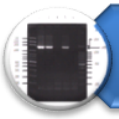

Selección del ensayo PCR en base al gen ARNr 16S de las Rickettsias.
Análisis *in silico* de la PCR convencional ARNr 16S (Parola y col., 2001).

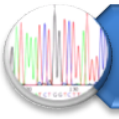

Selección del ensayo PCR en base al gen ARNr 16S de las Rickettsias.
Análisis *in silico* de la PCR-anidada ARNr 16S (Beall y col., 2008).

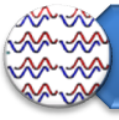
Normalización del ensayo PCR ARNr 16S seleccionado.

Diseño de cebadores genéricos para el ensayo PCR ARNr 16S convencional.

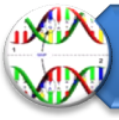
Normalización del ensayo PCR ARNr 16S convencional con los cebadores diseñados.


Evaluación de los productos de amplificación de la PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.


Purificación de los productos PCR a partir de geles de agarosa.


Secuenciación.

Análisis de restricción con los productos PCR.
Análisis *in silico* de los patrones de restricción de diversas enzimas.


Desarrollo del ensayo PCR-RFLP ARNr 16S de las Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*.

4.1. Obtención y conservación de la muestra

4.1.1. Muestras controles de ADN analizadas en el estudio

Las muestras sanguíneas fueron tomadas directamente de la vena cefálica del miembro anterior derecho de canes con signos clínicos de una infección Rickettsial, usando tubos colectores al vacío conteniendo EDTA. Las muestras fueron analizadas mediante frotis en capa blanca con colorante Giemsa para determinar la infección con *E. canis* y *A. platys*. A los individuos positivos parasitológicamente, se les tomaron nuevas muestras sanguíneas para el aislamiento de ADN en un lapso no mayor de 5 días hasta el aislamiento de ADN. Igualmente, se tomaron muestras sanguíneas en tubos sin anticoagulante para colectar suero. El ADN y los sueros furon preservados a 4ºC hasta su posterior uso (Facilitado por Omaira Parra, FCV-LUZ).

En los diferentes ensayos de PCR dirigidos a identificar *E. canis* y A. platys, se emplearon como controles positivos del ensayo PCR muestras de ADN aisladas de bovino, canes y humanos, escritos a continuación:

ADN de *A. marginale*, purificado de un bovino esplenectomizado e infectado experimentalmente con el aislado Am76615 procedente del estado Zulia, con una parasitemia del 25% y 1,8x 10^{10} glóbulos rojos infectados por mL de sangre.

ADN de *E. canis* 7-3257, purificado de un canino infectado naturalmente con esta Rickettsia y confirmado positivo clínica y parasitológicamente por frotis en capa blanca, proveniente del estado Zulia.

ADN de *A. platys* 44-93461, purificado de un canino infectado naturalmente con esta Rickettsia y confirmado positivo clínica y parasitológicamente por frotis en capa blanca, proveniente del estado Zulia.

ADN Shakira, purificado de un canino sin la infección Rickettsial, confirmado negativo mediante PCR.

ADN de humano (Yaremis), negativo a Ehrlichiosis mediante PCR.

ADN de cuatro muestras adicionales de *A. platys* y cuatro muestras adicionales de *E. canis*, positivas clínica y parasitológicamente por frotis en capa blanca, provenientes de los estados Zulia y Falcón. Muestras para secuenciar.

4.2. Extracción de ADN genómico

Para la obtención del ADN genómico se empleó el estuche de purificación de ADN de la casa comercial Promega “Wizard® Genomic ADN Purificatión", empleando 300 µL de muestra sanguínea y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Brevemente, se tomaron 900 µL de solución de lisis celular y se vertieron en un tubo para microcentrífuga de 1,5 mL al cuál se le agregaron 300 µL de sangre. Los volúmenes se mezclaron por inversión en 6 tiempos y la mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente para lisar las células blancas y rojas de la sangre. Posteriormente, se centrifugó en una microcentrífuga (Thermo Electron Corporation) a 16000xg por 20 seg a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular fué resuspendido en un agitador mecánico (Digisytem). Luego se agregaron 300 µL de solución de lisis nuclear y se mezcló la solución por inversión hasta tornarse viscosa. Seguidamente se agregaron 1,5 µL de RNAsa y se mezcló por inversión, dejando posteriormente la solución en incubación por 15 min a 37 ºC. Pasado este tiempo, se agregaron 100 µL de solución de precipitación proteica y se mezcló en un agitador mecánico por 20 seg, hasta observar los agregados proteicos, seguidamente se centrifugó la solución a 16000xg por 3 min a temperatura ambiente para obtener un sedimento marrón oscuro. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para microcentrífuga de 1,5 mL con 300 µL de isopropanol y se mezcló por inversión hasta observar la precipitación del ADN. Seguidamente se centrifugó a 16000xg por 1 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 300 µL de etanol al 70%. Se centrifugó la solución nuevamente a 16000xg por 1 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío en el SpeedVacc por 10 min a 65 ºC. Posteriormente se suspendió el precipitado con 100 µL de solución de rehidratación de ADN por 1 hora a 65 ºC. Finalmente, se almacenó el tubo para microcentrífuga conteniendo el ADN a 4 ºC hasta su posterior uso.

4.3. Cuantificación del ADN genómico

La cuantificación del ADN genómico se realizó empleando el espectrofotómetro NanoDrop® (IDEA), colocando 2 µL de la muestra de ADN sin diluir, sobre el pedestal plano y cuantificando la concentración en unidades de ng/µL.

4.4. Ensayos moleculares. PCR del gen ARNr 16S de las Rickettsias *E. canis* y *A. platys.*

Con la finalidad de hallar un ensayo PCR cuyos cebadores amplificaran una región variable del gen ARNr 16S de las Rickettsias que permitieran la posterior identificación especie-específica de *E. canis* y *A. platys*, se evaluaron los ensayos PCR reportados por Parola y colaboradores en el 2001 y por Beall y colaboradores en el 2008, a fín de determinar su potencial uso en los ensayos moleculares del presente trabajo de investigación.

4.4.1. Normalización del ensayo de la PCR–anidada del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie-específicos *A. platys*-s/*E.canis*-s/SEPas (Beall y col, 2008)

El ensayo de PCR que se empleó para el diagnóstico e identificación de Rickettsias en las muestras de ADN positivas clínica y parasitológicamente, se basó en el gen ARNr 16S de *E. canis* y *A. platys*, empleando los cebadores genéricos GEPs y GEPas (Eddlestone y col., 2007) y los especie-específicos Aplatys-s/ Ecanis-s/ SEPas (Dawson y col., 1996), descritos en la tabla 2, y conducen a la amplificación de productos de 431 pb (género-específicos) y de 392 pb de *E. canis* y 385 pb de *A. platys* (especie-específicos).

La normalización de la PCR-anidada, se realizó empleando como referencia las concentraciones reportadas en la literatura de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones empleadas en cuanto a los tiempos, las temperaturas y número de ciclos y la mezcla de reacción recomendadas por la Profesora Omaira Parra Maldonado (FCV-LUZ).

Tabla 2. Ubicación de los cebadores genéricos GEPs y GEPas (Eddlestone y col., 2007) y los especie-específicos *A. platys*-s/ *E. canis*-s/ SEPas (Dawson y col., 1996) en la secuencia del gen ARNr 16S.

Blanco	Cebadores	Ubicación Ext. 5` *	Ubicación Ext. 3` *	Nucleótidos	Secuencia (5`-3`)
ARNr 16S de Rickettsias	GEPs	39	73	35	CTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGA
	GEPas	435	470	36	CTTCTTCTATAGGTACCGTCATTATCTTCCTCATTG
	E. canis-s	49	77	29	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA
	A. platys-s	57	84	28	TTTGTCGTAGCTTGCTATGATAAAAATT
	SEPas	414	442	29	AGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAG

*Ubicación en nucleótidos con respecto a la secuencia de *A. marginale*, aislado de China (número de acceso en el GenBank HM538193.1).

La amplificación se llevó a cabo empleando la mezcla de reacción compuesta de: oligonucleótidos GEPs y GEPas a una concentración final de 0,5 µM; 1,5U de la enzima *Taq* polimerasa platinum (Invitrogen); tampón de la enzima 1X Invitrogen (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl); $MgCl_2$ 2mM; dNTPs 0,8mM y 100 ng de ADN genómico, en un volumen final de 25µL.

Los parámetros de temperatura y tiempo de incubación empleados en el ciclaje fueron los siguientes: un primer ciclo de desnaturalización a 95 ºC por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 ºC por 15 seg, 66ºC por 15 seg y 72 ºC por 15seg, con un ciclo de extensión final a 72 ºC por 1 min, empleando un termociclador Eppendorf modelo MasterCycler.

Para la determinación de la temperatura óptima del ensayo PCR se evaluaron 4 temperaturas de alineamiento simultáneamente: 62, 66 y 70 ºC en un termociclador Eppendorf modelo MastrCycler de gradiente. En la determinación de la concentración óptima de dNTPs se evaluaron dos concentraciones: 0,2 mM y 0,8 mM. Igualmente se determinó la cantidad de ADN óptimo para el ensayo realizando un gradiente de la concentración de ADN genómico, considerando las concentraciones finales de 25, 40, 60, 80 y 100 ng.

Adicionalmente, se evaluaron dos marcas comerciales de la enzima *Taq* polimerasa: la Go *Taq* (Promega) y la *Taq* platinum (Invitrogen), utilizando 1,5U por

reacción. Adicionalmente, se evaluaron diferentes alícuotas los cebadores manteniendo la concentración final en 0,5 µM en la mezcla de reacción.

4.4.2. Normalización del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col, 2001)

El ensayo de PCR que se empleó para el diagnóstico e identificación de Rickettsias en las muestras de ADN positivas clínica y parasitológicamente, se basó en el gen ARNr 16S de *E. canis* y *A. platys,* empleando los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR que se muestran en la tabla 3 (Parola y col., 2001), que conducen a la amplificación de un producto de 326 pb.

La normalización de la PCR convencional, se realizó empleando como referencia las concentraciones reportadas en la literatura de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones del ciclaje.

Tabla 3. Ubicación de los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2001) en la secuencia del gen ARNr 16S.

Blanco	Cebadores	Ubicación Ext. 5` *	Ubicación Ext. 3` *	Nucleótidos	Secuencia (5`-3`)
ARNr 16S de Rickettsias	EHR16SD	454	471	18	GGTACCYAYAGAAGAAGT
	EHR16SR	780	798	19	TAGCACTCATCGTTTACAG

*Ubicación en nucleótidos con respecto a la secuencia de *A. marginale* aislado de China (número de acceso en el GenBank HM538193.1).

La amplificación se llevó a cabo empleando la mezcla de reacción compuesta de: oligonucleótidos EHR16SD y EHR16SR a una concentración final de 0,5 µM; 1,5U de la enzima *Taq* polimerasa platinum (Invitrogen); tampón de la enzima 1X Invitrogen (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl); $MgCl_2$ 2mM; dNTPs 0,8mM y 100 ng de ADN genómico, en un volumen final de 25µL (Parola y col., 2001).

Los parámetros de temperatura y tiempo de incubación empleados en el ciclaje fueron los siguientes: un primer ciclo de desnaturalización a 95 ºC por 5 min, seguido de 45 ciclos de 95 ºC por 30 seg, 55ºC por 30 seg y 72 ºC por 1 min 30 seg, con un ciclo de extensión final a 72 ºC por 5 min, empleando un termociclador Eppendorf modelo MasterCycler (Parola y col., 2001).

Para la estandarización de la concentración óptima de dNTPs se evaluaron en dos ensayos diferentes las concentraciones finales de 0,2 mM y 0,8 mM. Igualmente se probaron tres concentraciones diferentes de $MgCl_2$ (2, 2,5 y 3mM).

Adicionalmente, como control se realizó un ensayo con alícuotas nuevas de los cebadores manteniendo la concentración final en 0,5 µM.

4.4.3. Diseño de cebadores del nuevo ensayo PCR para la amplificación del gen ARNr 16S de las Rickettsias

El diseño de cebadores sentido y antisentido para un nuevo ensayo de PCR en base al gen completo del ARNr 16S para la identificación de las especies de Rickettsias *E. canis* y *A. platys,* se inició con la búsqueda de las secuencias parciales y completas del gen ARNr 16S de las especies *E. canis, A. platys, A. marginale, E. chaffensis y A. phagocytophilum* en el GenBank. Adicionalmente, para el diseño del cebador sentido se consideró el oligonucleótido GEPs de Beall y colaboradores (2008).

Las secuencias seleccionadas fueron alineadas utilizando el programa Blast disponible en la página del NCBI, para establecer el grado de identidad. En base al porcentaje de identidad se seleccionaron los dominios del gen ARNr 16S con los valores más altos (mayores al 99%) sobre el gen completo para el diseño de los cebadores, utilizando los programas bioinformáticos OligoAnalizer 1.1.2 y Multalin 5.4.1. Se consideraron aquellos cebadores con valores similares para las siguientes características según Harris en 1998 y Sánchez y colaboradores en el 2004:

- Un Tm o Tf entre los 55 ºC y los 77 ºC.
- Un contenido de G+C de 50%
- Una longitud entre 18 y 30 nucleótidos.

4.4.3.1. Normalización del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S

Una vez seleccionados los cebadores de acuerdo a los criterios de la sección establecidos en el punto 4.4.3 denominados RYaF16S y RYaR16S (ver tabla 13 en la sección 5.4.2 de resultados), dirigidos a amplificar una región de 1450 pb del gen

completo del ARN 16S de las Rickettsias, se procedió a la normalización de las condiciones del ensayo PCR, considerando los parámetros de concentración de $MgCl_{2,}$ de los dNTPs, la temperatura de hibridación y el número de ciclos de amplificación.

La amplificación se llevó a cabo empleando una mezcla de reacción compuesta de: oligonucleótidos RYaF16S y RYaR16S a una concentración final de 0,5 µM; 1,5U de la enzima *Taq* polimerasa platinum (Invitrogen); tampón de la enzima 1X Invitrogen (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl); $MgCl_2$ 2mM; dNTPs 0,2mM y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 µL.

Los parámetros de temperatura y tiempo de incubación empleados en el ciclaje fueron los siguientes: un primer ciclo de desnaturalización a 95 ºC por 5 min, seguido de 45 ciclos de 94 ºC por 30 seg, 66ºC por 30 seg y 72 ºC por 1min y 30seg, con un ciclo de extensión final a 72 ºC por 5 min, empleando un termociclador Eppendorf modelo MasterCycler

4.4.3.2. Determinación de la especificidad y la sensibilidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S

La especificidad del nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S fue determinada empleando muestras de ADN de las especies de Rickettsia *E. canis*, *A. platys, A. marginale* y *Brucella abortus, E. coli* y muestras de ADN de humano, canino y bovino sanos, colocando 100 ng de ADN genómico de cada una.

La sensibilidad del nuevo ensayo PCR contra el gen ARNr 16s de las Rickettsias de interés fue determinada empleando dilusiones seriadas de los ADN utilizados como controles positivos de *E. canis* y *A. platys* en un rango entre 100 ng hasta los 0,0001 ng, partiendo de cantidades de ADN previamente cuantificadas.

4.4.4. Evaluación de los productos de amplificación de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.

Los productos de las reacciones de amplificación de PCR, fueron evaluados empleando geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X y teñidos con SYBR® safe ADN

gel, diluído $1/10^4$. Una vez polimerizados, se cargaron los 25 µL de los productos de amplificación con 5X Green GoTaq Flexi® Buffer de la casa comercial Promega en los bolsillos del gel. La corrida electroforética fue realizada en una cámara horizontal CSB Scientific por 1 hora a 100 V. Finalmente, las bandas de amplificación fueron observadas mediante un transiluminador de luz UV Uvitec y fotodocumentados en un equipo Uvisave. Se emplearon los marcadores de peso molecular de 100-10000 pb y de 100-1500pb de la casa comercial Promega y 100-3000 pb y 300-10000 pb de la casa comercial Axygen como referencia del tamaño del amplicón esperado.

4.4.5. Purificación del producto PCR

Con la finalidad de secuenciar los productos de amplificación obtenidos mediante el nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S, los amplicones fueron purificados por centrifugación, mediante el empleo del estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la casa comercial Promega, de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial.

Brevemente, los productos de amplificación del PCR contenidos en los 25 µL de reacción fueron colocados en una microcolumna SV insertada a su vez dentro de un tubo de recolección. Posteriormente, se agregó un volumen igual de solución de unión a la membrana seguido de una incubación de 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 16000xg por 1 min, descartando el sobrenadante. Se reinsertó la microcolumna en el tubo de recolección. Se agregaron 700 µL de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16000xg durante 1 min, se descartó el sobrenadante y se colocaron esta vez 500 µL de la solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16000xg por 5 min. La microcolumna SV se colocó en la centrífuga al vacío (Speedvacc) durante 5 min a 65 ºC para evaporar el etanol remanente de la solución de lavado. Luego, se transfirió la microcolumna a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y se agregaron 50 µL de H_2O ultrapura, previamente precalentada a 65 ºC. Se incubó durante 5 min para garantizar que el ADN unido a la membrana se separara de la misma y se centrifugó a 16000xg durante 1 min. Finalmente, se descartó la microcolumna y se guardó el producto PCR purificado a -20 ºC hasta su posterior uso.

4.4.6. Secuenciación e identificación de Rickettsias

Diez de los productos de amplificación de 1450 pb del nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S correspondientes a 10 muestras provenientes de los estados Zulia y Falcón (ver tabla 4, sección 5.1 de resultados) fueron purificados según el protocolo de la sección 4.4.5 y enviados al "The Oncogenomics Core Facility at Sylvester Comprehensive Cancer Center", extensión de la Universidad de Miami en los Estados Unidos de Norteamérica para su secuenciación, empleando los cebadores RYaF16S y RYaR16S mediante la técnica de secuenciación automatizada. 5 de las muestras fueron clínica y parasitológicamente positivas a la infección con *E. canis*, y 5fueron positivas a la infección con *A. platys.*

Las secuencias generadas fueron analizadas mediante el empleo de herramientas bioinformáticas, específicamente los programas de alineamiento MultAlin 5.4.1, ClustalX2, BioEdit y EMBOSS GUI 1.14, para determinar el porcentaje de similitud entre ellas y las secuencias reportadas en el GenBank. El análisis estuvo enfocado en la determinación del grado de identidad de las secuencias de las muestras problema y las reportadas en el GenBank para Venezuela con respecto al gen ARNr 16S de ambas Rickettsias, *E. canis* y *A. platys*.

4.4.7. Análisis del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S

La metodología PCR-RFLP se fundamenta en la identificación de polimorfismos en la secuencia de una región del ADN que generan la presencia o ausencia de sitios de reconocimiento y corte por endonucleasas de restricción. La región diana amplificada con cebadores específicos, es sometida al corte con una enzima de restricción específica y el producto de la digestión es sometido a un análisis electroforético para evaluar los patrones de bandas obtenidos.

Para el diseño del ensayo PCR-RFLP sobre el gen ARNr 16S se procedió a realizar un análisis *in sílico* mediante el empleo del programa bioinformático Sequencer 4.7 Demo, el cuál permitió generar el mapa de restricción computarizado de las secuencias parciales del gen ARNr 16S de *E. canis* y *A. platys* comprendidas entre los cebadores RYaF16S y RYaR16S para la selección de la enzima para el ensayo PCR-RFLP ARNr 16S. El criterio de selección de la enzima de restricción consideró que la

enzima cortara al gen ARNr 16S de ambas especies, generando un patrón de corte sencillo y diferente para cada especie d Rickettsia, que facilitara la observación e identificación en geles de agarosa.

Una vez seleccionada la enzima, se procedió experimentalmente a realizar la digestión de los productos obtenidos mediante el nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S, en un volumen final de 20 µL usando 10 µL del producto de amplificación y 8U de la enzima de restricción, incubando la mezcla durante 4 horas a 37 ºC.

Finalmente, los 20 µL de la digestión fueron evaluados con 5X Green GoTaq Flexi® Buffer en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X, teñido con SYBR safe®. La corrida electroforética fue realizada en una cámara horizontal CSB Scientific por 1 hora a 100 V. Finalmente, las bandas de amplificación fueron observadas mediante un transiluminador de luz UV Uvitec y fotodocumentados en un equipo Uvisave y su tamaño determinado utilizando como referencia el patrón de banda de los marcadores de peso molecular referidos en la sección 4.4.4.

4.4.7.1. Reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP

Con la finalidad de probar la validez del empleo del ensayo PCR-RFLP para el diagnóstico de las Rickettsias *E. canis* y *A. platys*, se realizó la digestión de los productos del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S de las 10 muestras secuenciadas (ver tabla 4, sección 5.1 de resultados) con la enzima seleccionada, a un volumen final de 20 µL empleando 10 µL de los productos de amplificación y 8U de la enzima de restricción, incubando la mezcla durante 4 horas a 37 ºC.

Los 20 µL de la digestión fueron evaluados con 5X Green GoTaq Flexi® Buffer en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X teñido con SYBR safe®. La corrida electroforética fue realizada en una cámara horizontal CSB Scientific por 1 hora a 100 V. Finalmente, las bandas de amplificación fueron observadas mediante un transiluminador de luz UV Uvitec y fotodocumentados en un equipo Uvisave.

Adicionalmente, las secuencias de *E. canis* y *A. platys* fueron evaluadas *in sílico* mediante el programa Sequencer 4.7 Demo el cual permitió generar el mapa de restricción computarizado de cada una de ellas, a fín de conocer si el sitio de corte de la

enzima seleccionada en la sección 4.4.7 se encontraba en las secuencias obtenidas, para confirmar el potencial uso del ensayo PCR-RFLP para la identificación de estos microorganismos Rickettsiales.

5. RESULTADOS

Siguiendo el esquema planteado para el desarrollo del objetivo general a través de cada uno de los objetivos específicos, se presentan los resultados obtenidos, iniciando con la obtención de las muestras sobre secuencias del gen ARNr 16S de diversas Rickettsias para la selección del ensayo de PCR ARNr 16S más adecuado y su posterior normalización, el análisis *in sílico* de la similitud de los cebadores de diversos ensayos de PCR sobre el gen ARNr 16S de organismos Rickettsiales, la identificación de los organismos Rickettsiales presentes en las muestras positivas por dicho ensayo PCR mediante secuenciación y el desarrollo del nuevo ensayo PCR-RFLP para el diagnóstico diferencial de los organismos Rickettsiales, específicamente *E. canis* y *A. platys.*

5.1. Obtención de muestras y purificación de ADNs

Para la evaluación de los ensayos de PCR se obtuvieron diez muestras de sangre completa de caninos positivos clínica y parasitológicamente, mediante frotis en capa blanca con colorante Giemsa, a la infección con *E. canis* (5 muestras) y a la infección con *A. platys* (5 muestras).

El ADN de cada una de las muestras fue extraído y cuantificado previo a su uso en el desarrollo de las técnicas moleculares de este trabajo de investigación. En la tabla 4 se puede observar de forma resumida la descripción de cada muestra.

Tabla 4. Resultados de la evaluación clínica, parasitológica y molecular, hechas previamente a las muestras empleadas en los ensayos moleculares del trabajo de investigación.

Muestra de ADN	Orígen	Ubicación geográfica	Evaluación clínica	Frotis en Capa Blanca	PCR	Concentración de ADN (ng/µL)
3 (*A. platys*)	Perro	Zulia	+	+		144,7
1 (*E. canis*)	Perro	Zulia	+	+		88
15 (*E. canis*)	Perro	Zulia	+	+	NA	89,5
8-91669 (*A. platys*) (S)	Perro	Zulia	+	+	NA	130,4
8 (*A. platys*, SH Jade) (S)	Perro	Zulia	+	+	+	171,92
26-93116 (*E. canis*) (S)	Perro	Zulia	+	+	+	1052
36 (*E. canis* Cupido) (S)	Perro	Zulia	+	+	+	499,2
4- 89185(A. platys) (S)	Perro	Zulia	+	+	+	700,9
3 (*E. canis*) (S)	Perro	Falcón	+	+	+	464,9
10-89579 (*A. platys*) (S)	Perro	Zulia	+	+	+	207,4
44-93461 (*A. platys*) (S)*	Perro	Zulia	+	+	+	240,6
7-3257 (*E. canis* Cliford) (S)*	Perro	Zulia	+	+	+	71,4
ADN Yaremis	Humano	Caracas	-	-	-	96
ADN Shakira	Perro	Anzoategui	-	-	-	236
ADN *Brucella. abortus*	Bovino	Caracas	NA	+	-	164
ADN bovino sano	Bovino	Zulia	-	-	-	207
ADN *A. marginale* *	Bovino	Zulia	-	+	+	216
ADN *Escherichia. coli*	DND	Caracas	NA		-	2800

NA: no analizado
*Muestras empleadas controles positivos en los ensayos PCR evaluados.
(S) Muestras secuenciadas

Es importante señalar, que las muestras número 44 positiva a la infección con *A. platys* y número 7, positiva a la infección con *E. canis* (señaladas con asteriscos en la tabla 4) fueron empleadas como controles positivos en los ensayos de PCR evaluados, considerando que para ambos casos se tenía el mayor volumen de muestra.

Finalmente, las muestras de ADN fueron purificadas y almacenadas tal como se describe en la sección 4.4.5 hasta su posterior secuenciación.

5.2. Alineamientos de secuencias del gen ARNr 16S y ubicación de los cebadores de las pruebas de PCR reportadas por Beall y col., 2008 y Parola y col., 2001

Iniciamos el trabajo con la evaluación del grado de identidad en los diferentes dominios a lo largo del gen ARNr 16S de 5 especies de Rickettsias. En la tabla 5 podemos observar el número de acceso en el GenBank de las secuencias empleadas para los alineamientos de las Rickettsias *A. platys*, *E. canis*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum* y *E. chaffensis*.

Tabla 5. Números de acceso al GenBank y número de nucleótidos que conforman las secuencias parciales del gen ARNr 16S de diversas Rickettsias, usadas el alineamiento que permitió establecer la secuencia consenso para la selección de los cebadores genéricos del ensayo PCR ARNr 16S.

Número de acceso	Secuencia parcial ARNr 16S	Tamaño (pb)
EF195135.1	*Ehrlichia canis* cepa Brazil-CO2 gen ARNr 16S, secuencia parcial	1476
AF162860.1	*Ehrlichia canis* gen ARNr 16S, secuencia parcial	1527
AY077619.1	*Anaplasma platys* aislado Okinawa gen ARNr 16S, secuencia parcial	1488
EF139459.1	*Anaplasma platys* gen ARNr 16S, secuencia parcial	1522
AF309868.1	*Anaplasma marginale* cepa South Idaho gen ARNr 16S, secuencia parcial.	1504
HM538193.1	*Anaplasma marginale* clon 1s de China gen ARNr 16S, secuencia parcial	1526
U86665.1	*Ehrlichia chaffeensis* gen ARNr 16S, cds parcial	1477
NR_037059.1	*Ehrlichia chaffeensis* cepa Arkansas 16S ribosomal RNA, secuencia parcial	1477
AY969015.1	*Anaplasma phagocytophilum* clon J4-3-7 gen ARNr 16S, secuencia parcial	1466
JN558811.1	*Anaplasma phagocytophilum* aislado YDH6 clon 6 gen ARNr 16S, secuencia parcial	1471

Posteriormente, evaluamos la ubicación de los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie-específicos *A. platys*-s/*E.canis*-s/SEPas reportados por Beall y colaboradores en el 2008, y la ubicación de los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR reportados por Parola y colaboradores en el 2001.

Los resultados de los alineamientos de un total de 10 secuencias del gen del ARNr 16S, dos por cada especie de *E. canis, A. platys, E. chaffensis, A. marginale* y *A. phagocytophilum*, con los cebadores GEPs/GEPas y los cebadores

EHR16SD/EHR16SR, se muestran en las figuras 3 y 4. El alineamiento de dos secuencias de *E. canis* con los cebadores especie-específicos *E. canis*-s/SEPas y dos secuencias de *A. platys* con los cebadores especie-específicos *A. platys*-s/SEPas se muestran en las figuras 5 y 6 respectivamente. Estos resultados mostraron que para todas las pruebas, los pares de cebadores hibridan en un 100% de su secuencia con dominios en el gen ARNr 16S.

El ensayo descrito por Parola amplifica una región de 326 pb conservada en todas las especies analizadas (Figura 4), mientras que los pares de cebadores GEPs y GEPas reportados por Beall y colaboradores, si bien hibridan sobre dominios conservados, amplifican 431 pb que contienen una región variable de aproximadamente 35 pb entre las secuencias analizadas (Figura 3). El alineamiento del par de cebadores especie-específicos *E. canis*-s y SEPas muestra que el cebador sentido *E. canis*-s hibrida en la región variable contínua al cebador sentido genérico GEPs, mientras que el cebador antisentido SEPas lo hace en una región conservada, amplificando un fragmento de 392 pb en la especie *E. canis* de aislados a nivel mundial (Figura 5), como en secuencias de aislados venezolanos (resultados no mostrados). Por otra parte, el alineamiento del par de cebadores especie-específicos *A.platys*-s y SEPas muestra que, el cebador sentido *A. platys*-s hibrida, al igual que en el caso anterior, en una región variable contínua al cebador sentido genérico GEPs, mientras que el cebador antisentido al tratarse del mismo SEPs se mantiene anclado en un dominio conservado, amplificando en este caso una región de 385 pb en la especie *A. platys* en todos los aislados (Figura 6), incluyendo secuencias de aislados venezolanos (resultados no mostrados).

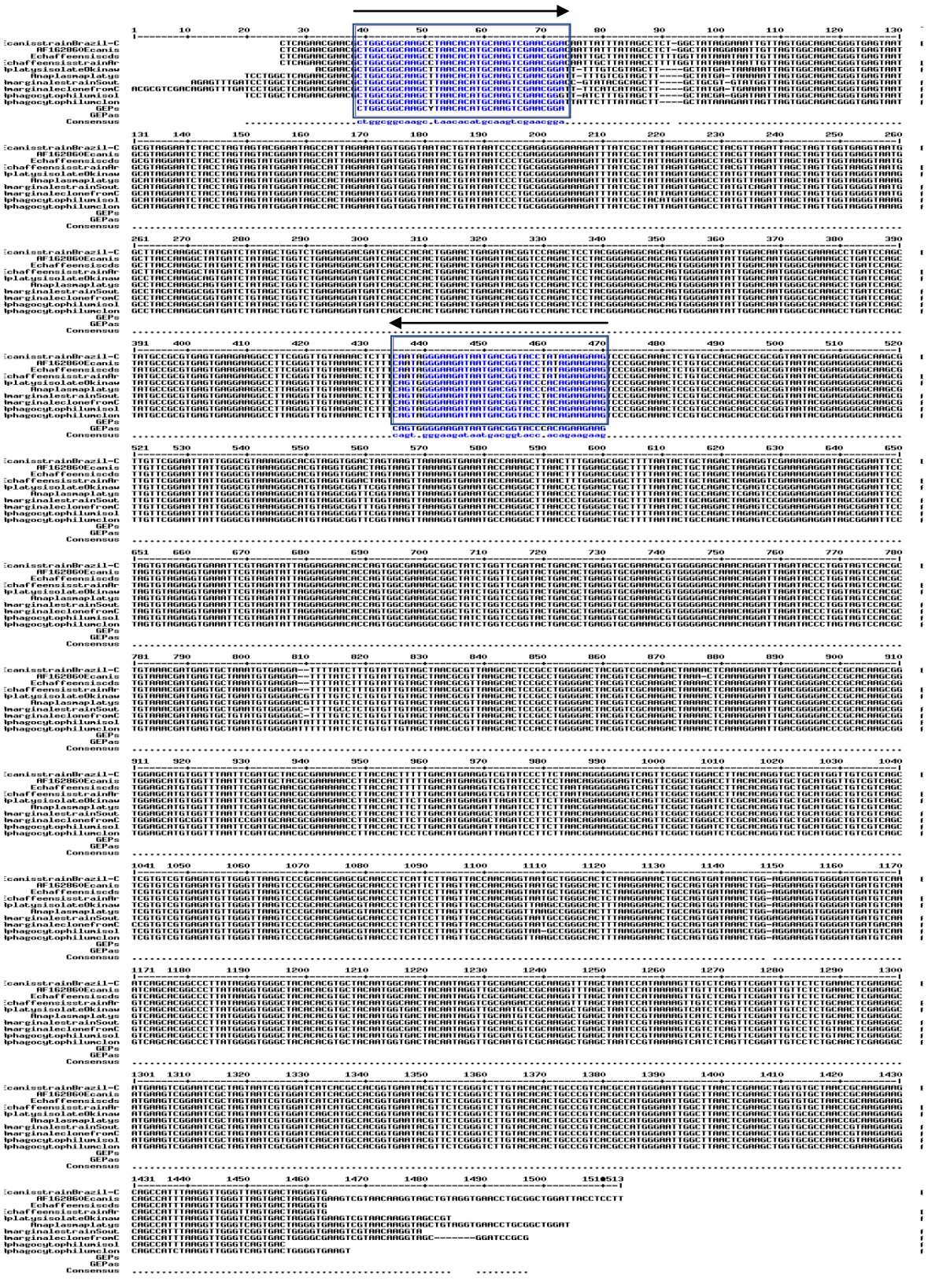


Figura 3. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores GEPs y GEPas. Se muestra dentro del recuadro azul donde hibridan los cebadores genéricos GEPs y GEPas y las 431 pb que amplifican (Beall y col, 2008).

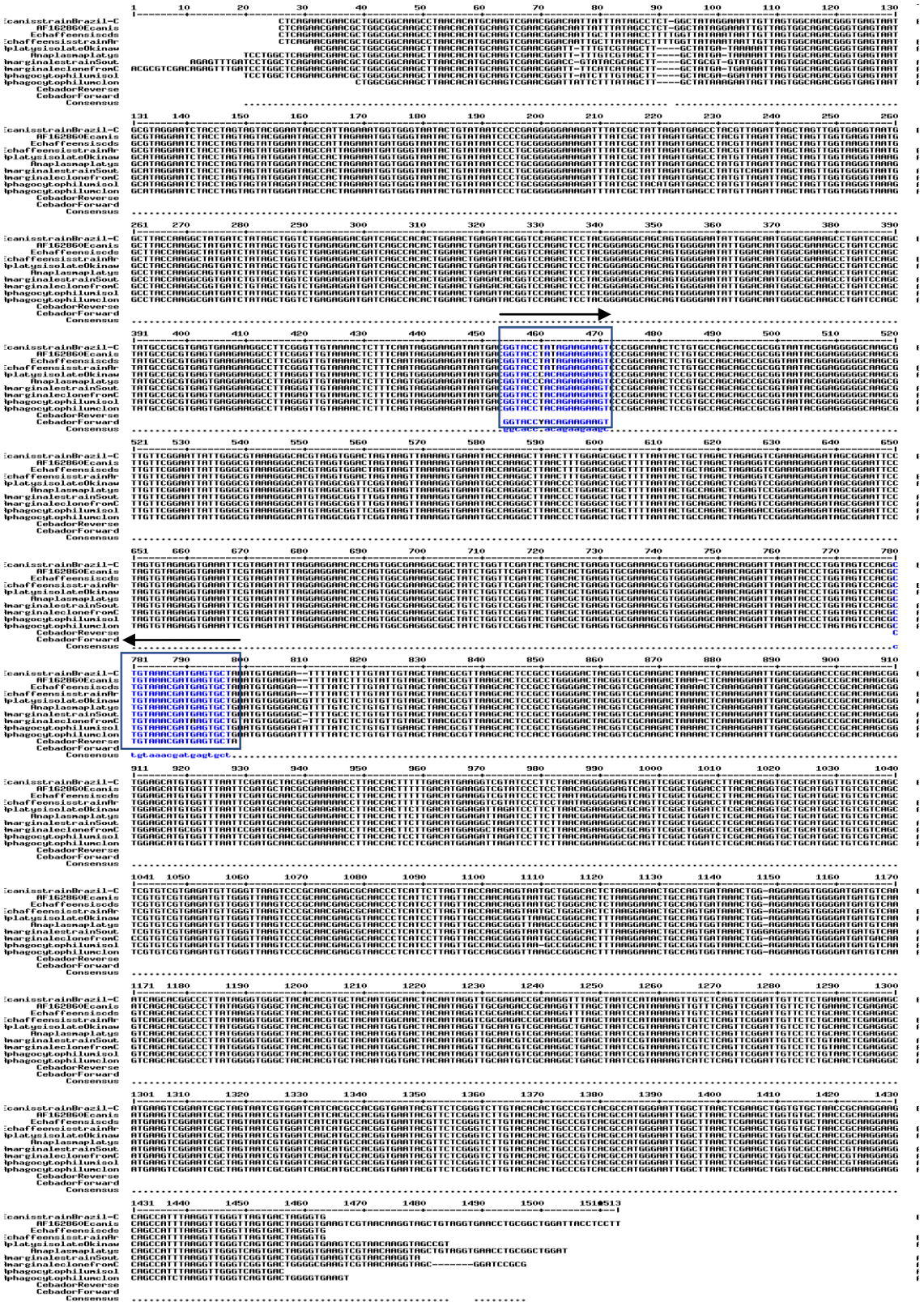


Figura 4. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores EHR16SD y EHR16SR. Se muestran dentro de los recuadros azules, la posición de los nucleótidos donde hibridan los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR y las 326 pb que amplifican (Parola y col, 2000).

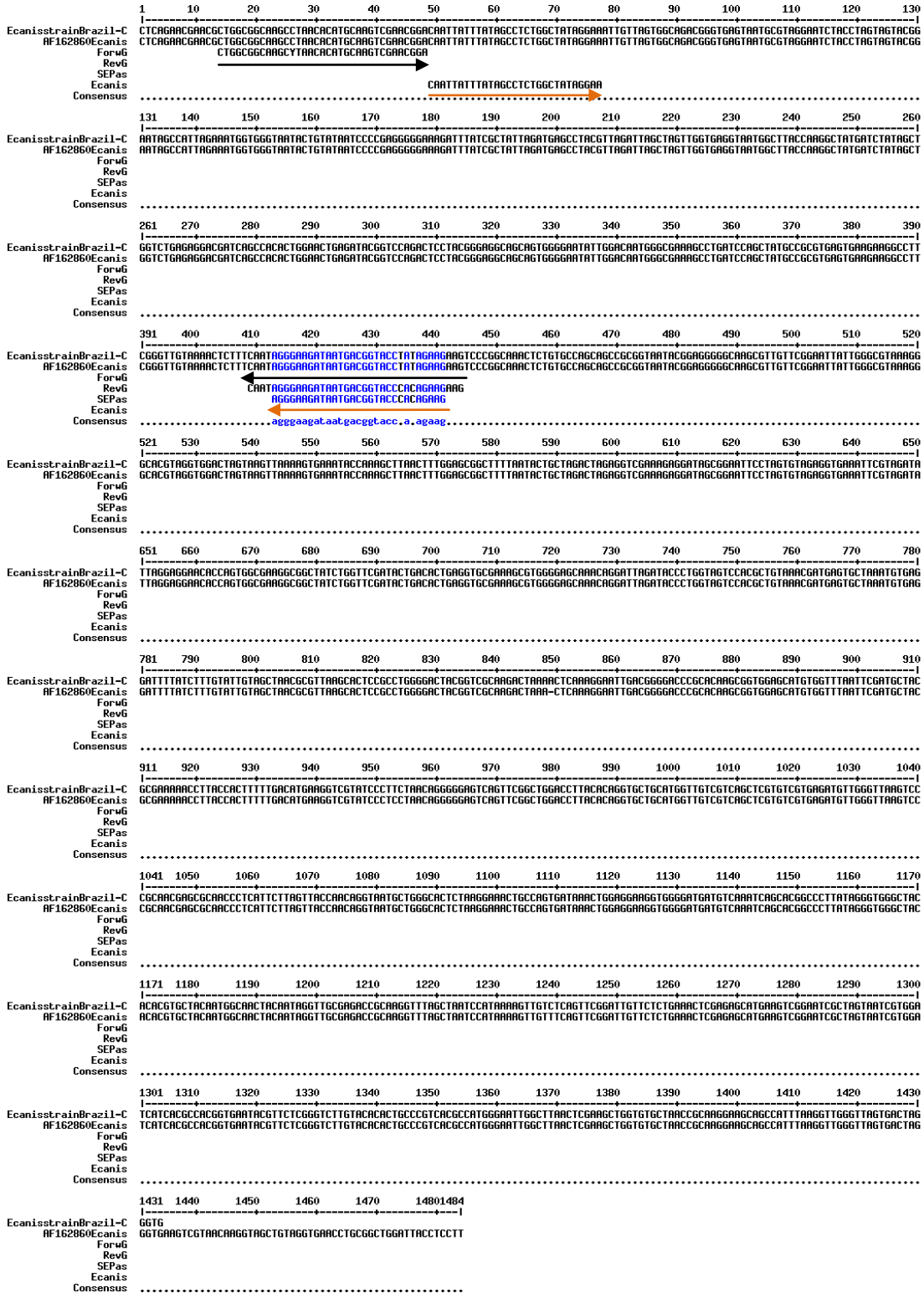


Figura 5. Alineamiento de dos secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis* (EF195135.1 y AF162860.1) con los cebadores *E. canis*- específicos *E. canis*-s y SEPas. Representados por una flecha negra, se muestra donde hibridan los cebadores genéricos GEPs y GEPas y representados por una flecha naranja, se muestra donde hibridan los cebadores especie- específicos *E. canis*-s y SEPas y las 392 pb que éstos amplifican (Beall y col, 2008).

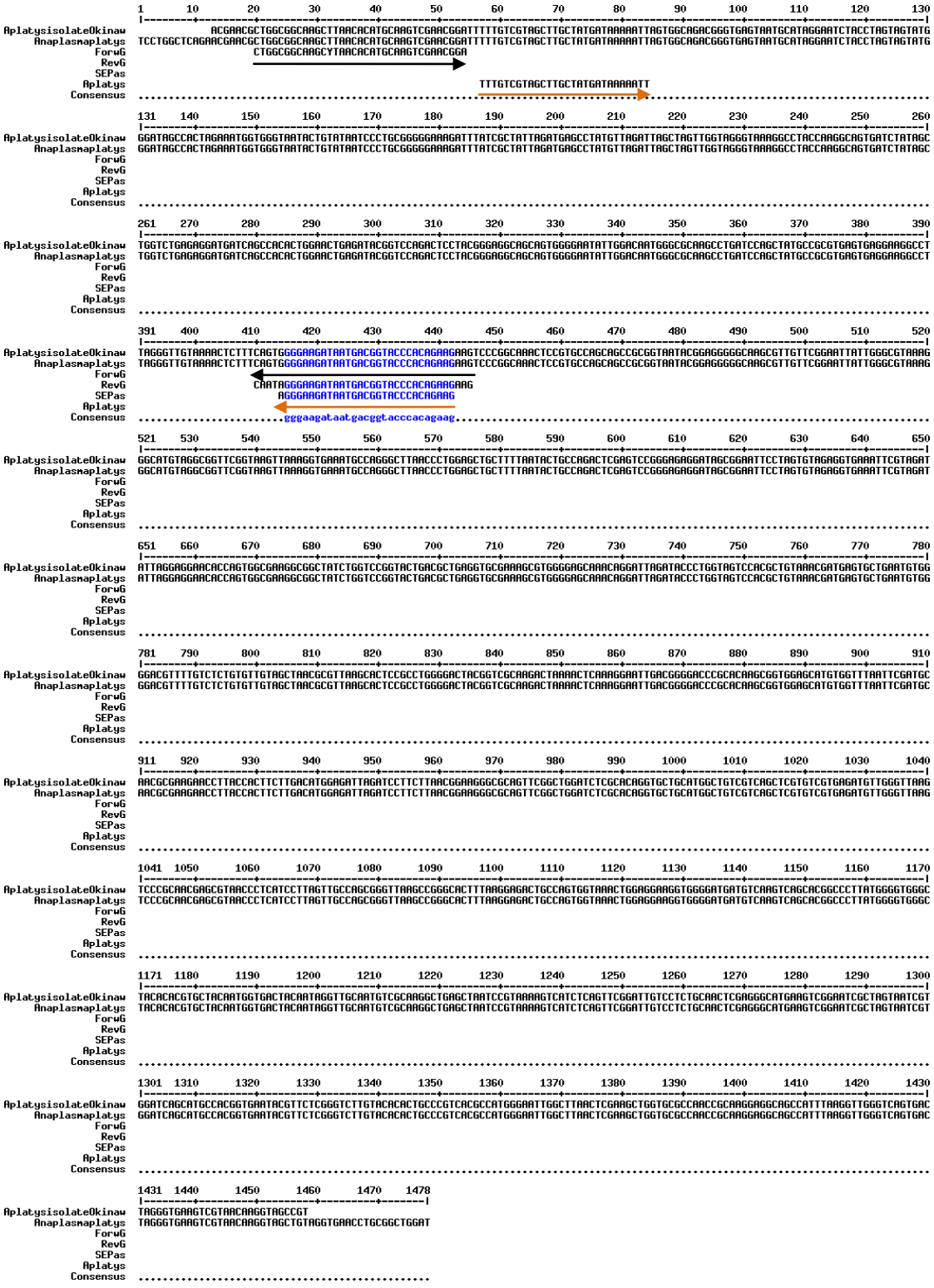


Figura 6. Alineamiento de dos secuencias del gen ARNr 16S de *A. platys* (AY077619.1 y EF139459.1) con los cebadores *A. platys*-s y SEPas. Representados por una flecha negra, se muestra donde hibridan los cebadores genéricos GEPs y GEPas y representados por una flecha naranja, se muestra donde hibridan los cebadores especie-específicos *A. platys*-s y SEPas y las 385 pb que éstos amplifican (Beall y col, 2008).

5.3. Normalización de las pruebas de PCR-anidada (Beall y col., 2008) y PCR convencional (Parola y col., 2001), en base al gen ARNr 16S de las Rickettsias.

Luego de haber realizado el análisis *in sílico* de los cebadores de los ensayos PCR de Beall (2008) y Parola (2001), se procedió a realizar la normalización de las condiciones de la reacción de amplificación variando la concentración de $MgCl_2$ y dNTPs, los tiempos de la mezcla de reacción y el número de ciclos, con la finalidad de seleccionar el ensayo de mejor desempeño para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación.

5.3.1. Normalización de la PCR-anidada (Beall y col., 2008)

En este caso se evaluaron los cebadores genéricos denominados GEPs (sentido) y GEPas (antisentido) de 35 pb y 36 pb respectivamente, los cuales amplifican una región de 431 pb del gen ARNr 16S, como se observa en la figura 5. Es importante señalar que estos iniciadores amplifican una región con alta variabilidad entre las bases 74 y la 103 del gen ARNr 16S, permitiendo este ensayo PCR-anidado ARNr 16S en conjunto con la secuenciación la identificación de especies en las Rickettsias. Por su parte, los cebadores especie- específicos (internos) de este ensayo PCR-anidado ARNr 16S, permiten la identificación de las Rickettsias *E. canis* y *A. platys*: *E. canis*-s y SEPas (sentido y antisentido) con 29 pb cada uno, amplifican una región de 392 pb dentro del producto de amplificación de los cebadores genéricos para *E. canis*. Por su parte *A. platys*-s y SEPas (sentido, antisentido) con 28 pb y 29 pb respectivamente, permiten la identificación específica de *A. platys* y amplifican una región de 385 pb dentro del producto de amplificación de los cebadores genéricos. Adicionalmente, en la tabla 6, se muestran características adicionales de interés de los cebadores tanto genéricos como especie-específicos de este ensayo PCR-anidado ARNr 16S, consideradas en su selección.

Tabla 6. Características de los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los espcie-específicos E.canis-s/A.platys-s/SEPas para el ensayo PCR-anidado ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*

Blanco	Cebadores	Tm (ºC)	%GC	Secuencia (5`-3`)	Región amplificada (pb)
ARNr 16S de las Rickettsias	GEPs	108	54,3	CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA	431
	GEPas	104	44,4	CTTCTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCYCAYTG	
	E. canis-s	78	34,5	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA	392
	A. platys-s	72	28,6	TTTGTCGTAGCTTGCTATGATAAAAATT	385
	SEPas *	86	48,3	AGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAG	

*Cebador reverse común para los cebadores forward especie-específicos *E. canis*-s y *A. platys*-s

Una vez conocido los tamaños de las bandas de amplificación esperadas con los cebadores genéricos y especie-específicos, se procedió a normalizar el ensayo PCR-anidado ARNr 16S, considerando las condiciones de ciclado y de mezcla de reacción mostradas en las tablas 7, 8 y 9, tomadas y modificadas de Beall y col., 2008 y de la Profesora Omaira Parra Maldonado (FCV-LUZ).

Tabla 7. Condiciones del ciclado del ensayo PCR-anidado ARNr 16S con los cebadores genéricos GEPs y GEPas y los especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Beall y col., 2008).

Ciclos	Repeticiones	Etapas	Temperatura (ºC)	Tiempo
1	1	Desnaturalización	95	5 min
2	40	Desnaturalización	94	15 seg
		Alineamiento	(ver tabla 8)	15 seg
		Extensión	72	15 seg
3	1		72	1 min
4	1	Mantenimiento	4	-

Tabla 8. Temperatura de alineamiento de los cebadores tanto genéricos: GEPs y GEPas como especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Beall y col., 2008).

Cebadores	Temperatura de alineamiento
Género- específicos	66 ºC
Especie- específicos	58 ºC

Tabla 9. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR-anidado ARNr 16S tanto con los cebadores genéricos: GEPs y GEPas como con los especie específicos: *A. platys*-s, *E. canis*-s y SEPas (Facilitado por la Dra. Omaira Parra).

Componente	Conc. final
Tampón Taq polimerasa	1X
$MgCl_2$	2 mM
dNTPs	0,8 mM
Iniciador GEPs	0,5 uM
Iniciador GEPas	0,5 uM
Enzima *Taq platinum*	1,5 U
ADN	100 ng

*Volumen de reacción 25 µL

Al realizar el ensayo PCR con los cebadores GEPa y GEPas bajo las condiciones descritas (tabla 9) con 100 ng de ADN de cada muestra control de las Rickettsias de interés: *A. platys* y *E. canis*, no se observó la banda de amplificación de esperada de 431 pb.

En la figura 7 se puede observar el gradiente de temperatura desde los 62°C a los 70 °C, realizado para determinar la temperatura óptima de hibridación de los cebadores GEPs y GEPas, con las muestras de ADN controles de *A. platys* (carriles 5,6 y 7) y *E. canis* (carriles 2, 3 y 4). No se observó la banda de amplificación en ninguno de los casos.

Posteriormente, al no obtener la banda de amplificación esperada, se evaluaron dos Taq polimerasas en el ensayo PCR: *Taq* platinum y Go *Taq* cuyos resultados se presentan en la figura 8. Se observa que al comparar ambas polimerasas tampoco fue posible observar las bandas de amplificación esperadas.

Finalmente en el ensayo con los cebadores GEPs y GEPas, se varió la concentración de dNTPs en la mezcla de reacción, como se muestra en la figura 9: carriles 2, 3, 4 y 5 con 0,8 mM y carriles 7, 8, 9 y 10 con 0,2 mM. Sin embargo, no se observó ningún amplificado.

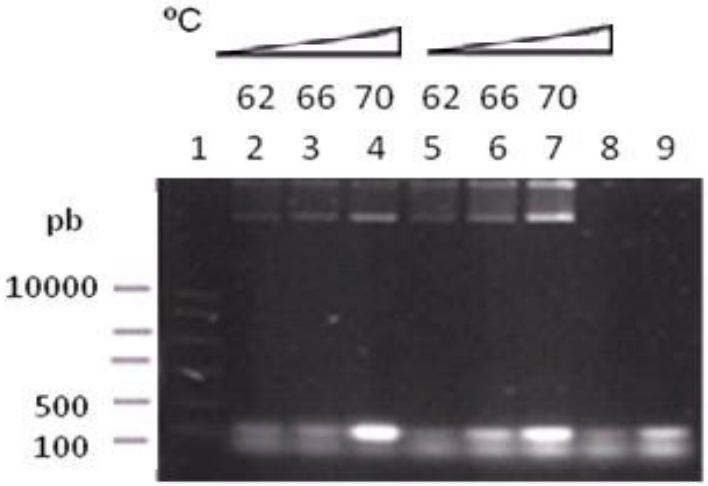


Figura 7. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas y determinación de la temperatura óptima de alineamiento en el ensayo PCR ARNr 16S. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores GEPs y GEPas con 100 ng de las muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *A. platys* y *E. canis*. Carril 1: marcador de peso molecular de 100-10000 pb; Carril 2: ADN de *E. canis* 7-3257 - 62°C; Carril 3: ADN de *E. canis* 7-3257 - 66°C; Carril 4: ADN de *E. canis* 7-3257 – 70 °C; Carril 5: ADN de *A. platys* 44-93461 - 62 °C; Carril 6: ADN de *A. platys* 44-93461 - 66 °C ; Carril 7: ADN de *A. platys* 44-93461 - 70 °C ; Carril 8: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; carril 9: H_2O, control negativo.

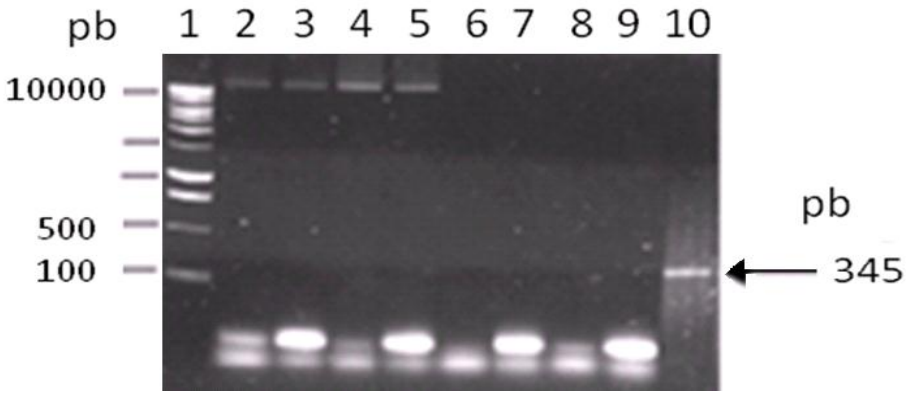


Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas comparando las ADN polimerasas *Taq* platinum y Go *Taq*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores diseñados GEPs y GEPas en muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *E. canis* y *A. platys*. Carril 1: marcador de peso molecular 100-10000 pb ; Carril 2: ADN de *A. platys* 44-93461 - *Taq* platinum; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461 - Go *Taq*; Carril 4: ADN de *E. canis* 7-3257 - *Taq* platinum; Carril 5: ADN de *E. canis* 7-3257 - Go *Taq*; Carril 6: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo - *Taq* platinum; Carril 7: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo - Go *Taq*; Carril 8: H_2O, control negativo - *Taq* platinum; Carril 9: H_2O, control negativo - Go *Taq*; Carril 10: marcador de peso molecular de 345 pb.

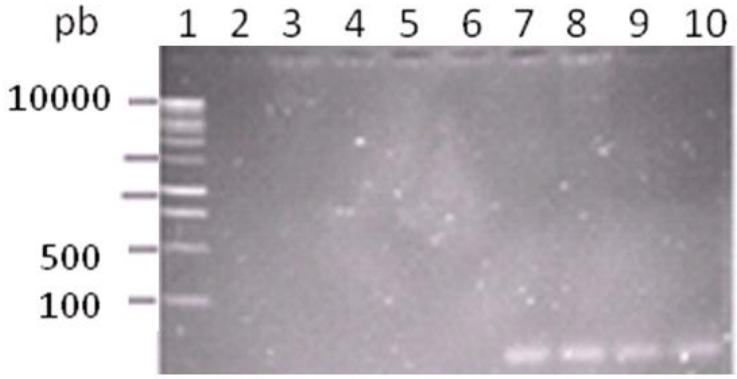


Figura 9. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores GEPs y GEPas variando la concentración de dNTPs. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando lel resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores GEPs y GEPas con 100 ng de la muestra control de ADN proveniente de un canino sospechoso de infección por *A. platys*. Carriles 2, 3, 4 y 5 a 0,8mM y carriles 7, 8, 9 y 10 a 0,2mM. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100-10000pb; Carril 2: ADN de Can Rowaldo– 0,8 mM; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461 – 0,8 mM; Carril 4: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo - 0,8mM; Carril 5: H_2O, control negativo – 0,8mM; Carril 6: vacío; Carril 7: ADN de Can Rowaldo – 0,2 mM; Carril 8: ADN de *A. platys* 44-93461 – 0,2 mM; Carril 9: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo – 0,2 mM; carril 10: H_2O, control negativo – 0,2 mM.

Considerando los resultados negativos obtenidos, se decidió determinar la cantidad óptima de ADN de la muestra para el ensayo PCR, para lo cuál se consideró el ADN genómico de la muestra 44 positiva clínica y parasitológicamente a infección con *A. platys*, Se evaluaron las concentraciones desde 25 ng hasta 100 ng de ADN, considerando que altas concentraciones de ADN pueden inhibir la amplificación en el ensayo PCR.

En la figura 10 se muestra el registro fotográfico obtenido en este ensayo PCR con los cebadores GEPs y GEPas observándose la ausencia de la banda de amplificación esperada. Esta titulación de la concentración de ADN fue repetida utilizando nuevas alícuotas de los cebadores GEPs y GEPas, con resultados negativos similares mostrados en la figura 11.

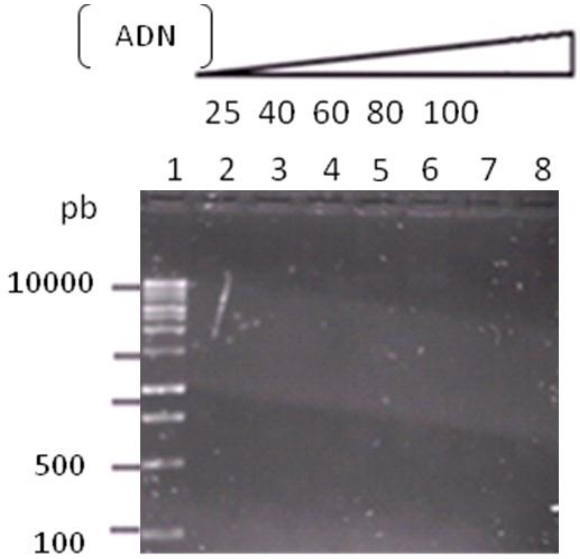


Figura 10. Determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo PCR ARNr 16S para la identificación de Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores GEPs y GEPas. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S en la muestra control de ADN proveniente de un canino sospechoso de infección por *A. platys*. Carril 1: marcador de peso molecular Promega de 100-10000 pb; Carril 2: ADN de *A. platys* 44-93461 - 25ng; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461 - 40ng; Carril 4: ADN de *A. platys* 44-93461 - 60ng; Carril 5: ADN de *A. platys* 44-93461 - 80ng ADN; Carril 6: ADN de *A. platys* 44-93461 - 100ng; Carril 7: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 8: H_2O, control negativo.

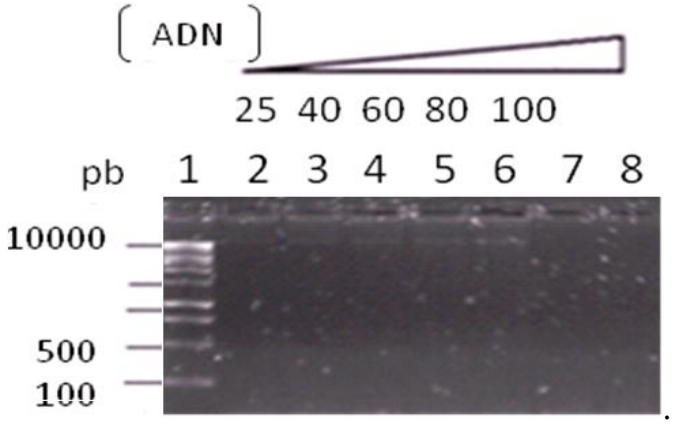


Figura 11. Ensayo control. Determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores GEPs y GEPas. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores GEPs y GEPas en la muestra control de ADN proveniente de un canino sospechoso de infección por *A. platys*. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100-10000pb; Carril 2: ADN de *A. platys* 44-93461 - 25ng; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461 - 40ng; Carril 4: ADN de *A. platys* 44-93461 - 60ng; Carril 5: ADN de *A. platys* 44-93461 - 80ng; Carril 6: ADN de *A. platys* 44-93461 - 100ng; Carril 7: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; carril 8: H_2O, control negativo.

Los diferentes intentos de amplificación con los cebadores GEPs y GEPas variando las condiciones de temperatura de alineamiento, concentración de ADN, fuente de ADN, *Taq* polimerasa y alícuotas de los stocks de los cebadores, no permitieron la amplificación de la banda de 431 pb que representa el templado para la segunda ronda de amplificación en este ensayo anidado especie-específico con los iniciadores *A. platys*-s/*E. canis*-s/SEPas. Por ello, se procedió a normalizar el ensayo de Parola y col., 2001.

5.3.2. Normalización de la PCR convencional (Parola y col., 2001)

En principio, se consideraron los cebadores genéricos publicados por Parola y colaboradores en el 2001, denominados EHR16SD de 18 pb (sentido) y EHR16SR de 19 pb (antisentido). En la tabla 10 se muestran otras características de Tm, contenido G+C y longitud relevantes para la amplificación con estos cebadores.

Tabla 10. Características de los cebadores EHR16SF y EHR16SR para el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma.*

Blanco	Cebadores	Tm (°C)	%GC	Secuencia (5`-3`)	Región amplificada (pb)
ARNr 16S de las Rickettsias	EHR16SD	52	44,4	GGTACCYACAGAAGAAGT	326
	EHR16SR	54	42,1	TAGCACTCATCGTTTACAG	

Una vez conocido el tamaño de la región que amplifican los cebadores EHR16SF y EHR16SR, se procedió a normalizar el ensayo de PCR ARNr 16S considerando las condiciones y ciclado mostradas en las tablas 11 y 12, tomadas y modificadas de Parola y col., 2001:

Tabla 11. Condiciones del ciclado del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2000).

Ciclos	Repeticiones	Etapas	Temperatura (ºC)	Tiempo
1	1	Desnaturalización	95	5 min
2	45	Desnaturalización	95	30 seg
		Alineamiento	55	30 seg
		Extensión	72	1 min, 30 seg
3	1		72	5 min
4	1	Mantenimiento	4	-

Tabla 12. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR (Parola y col., 2000).

Componente	Conc. final
Tampón Taq polimerasa	1X
$MgCl_2$	2 mM
dNTPs	0,8 mM
Iniciador EHRD16S	0,5 µM
Iniciador EHRF16S	0,5 uM
Enzima *Taq platinum*	1,5 U
ADN	100 ng

*Volumen de reacción 25 µL

Al realizar el ensayo PCR con cebadores genéricos EHR16SD y EHR16SR, se observó la amplificación de la banda específica de 345 pb en todas las muestras de controles positivos de las Rickettsias *E. canis*, *A. platys* y *A. marginale* (carriles 4, 7 y 9), así como en todas las muestras de perros evaluadas, a excepción de la muestra *E. canis* 15 (carriles 2, 3, 5 y 6), usando una concentración de 0,2 mM de dNTPs. Sin embargo, en todas las muestras se observó un barrido de amplificación inespecífica, por lo que se requirió seguir normalizando el ensayo.

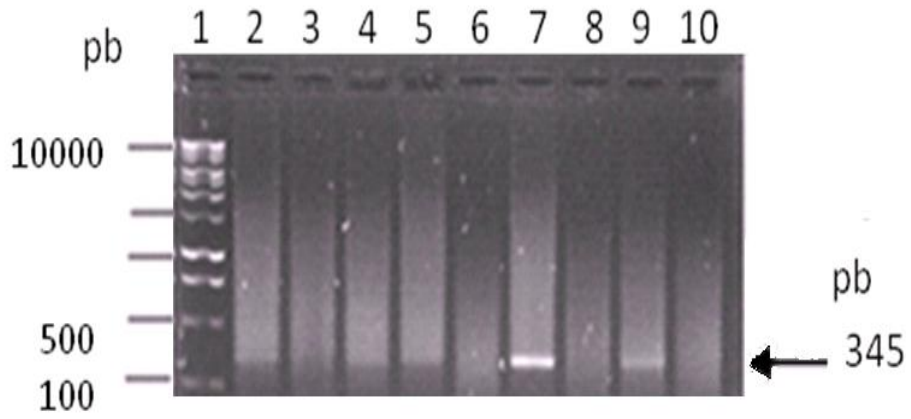


Figura 12. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR en el ensayo PCR ARNr 16S. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores EHR16SD y EHR16SR y 100 ng de las muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *E. canis* y *A. platys* y en muestras corrientes. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100-10000pb; Carril 2: ADN de *A. platys* 8-SH Jade; Carril 3: ADN de *E. canis* 1; Carril 4: ADN de *E. canis* 7-3257; Carril 5: ADN de *A. platys* 8-91669*;* Carril 6: ADN de *E. canis* 15; Carril 7: ADN de *A. platys* 44-93461; Carril 8: ADN de *A. platys* 3; Carril 9: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 10: H_2O, control negativo.

En el caso de la figura 13, al variar la concentración de dNTPs a 0,8 mM, se observa la amplificación de una banda de 345 pb para los carriles 3, 4 y 5 con un resultado negativo en ausencia de ADN (carril 6). Sin embargo, variar la concentración de dNTPs no fue suficiente para eliminar el barrido.

En la figura 14, se reporta el registro fotográfico del ensayo realizado empleando nuevas alícuotas de los cebadores EHR16SD y EHR16SR, manteniendo las mismas condiciones en la mezcla de reacción, número de ciclos y temperatura del ciclaje de los resultados en la figura 12, observándose una banda de amplificación de 345 pb para las muestras controles de *A. platys* y *A. marginale* con las nuevas alícuotas de los cebadores utilizadas para verificar su integridad (carriles 3 y 4). Sin embargo, se mantuvo la amplificación inespecífica.

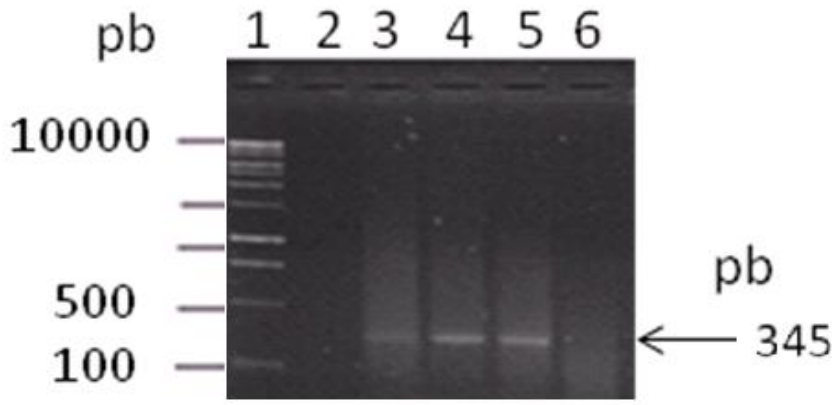


Figura 13. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR incrementando la concentración de dNTPs. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores EHR16SD y EHR16SR en muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *A. platys* y *E. canis*, con una concentración de 0,8 mM. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100-10000pb; Carril 2: vacío; Carril 3: ADN de *E. canis* 7-3257; Carril 4: ADN de *A. platys* 44-93461; Carril 5: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 6: H_2O, control negativo.

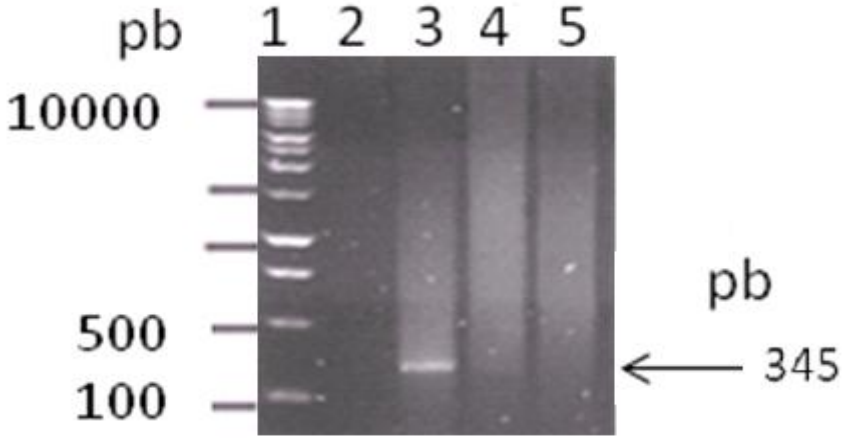


Figura 14. Ensayo control. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SR en el ensayo PCR ARNr 16S. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando nuevas alícuotas de los cebadores EHR16SD y EHR16SR con 100 ng de la muestra control de ADN proveniente de un canino sospechoso de infección con *A. platys*. Carril 1: marcador de peso molecular 100-10000 pb; Carril 2: vacío; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461; Carril 4: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 5: H_2O, control negativo.

Por último, al titular la concentración de $MgCl_2$ utilizando un gradiente de concentraciones de 2 mM, 2,5 mM y 3 mM, se observa una amplificación con una banda de 345 pb para las muestras control de *A. platys* y *A. marginale*, con un resultado negativo en ausencia de ADN (carriles 3, 6 y 9) como se puede apreciar en la figura 15. La titulación del $MgCl_2$ no modificó la presencia del barrido en la reacción de amplificación, para la concentración 2 mM (carriles 2 y 3), disminuyó su intensidad con el incremento de la concentración de $MgCl_2$ a 2,5 mM (carriles 5 y 6) y se hace menos evidente a la concentración de 3 mM (carriles 8 y 9).

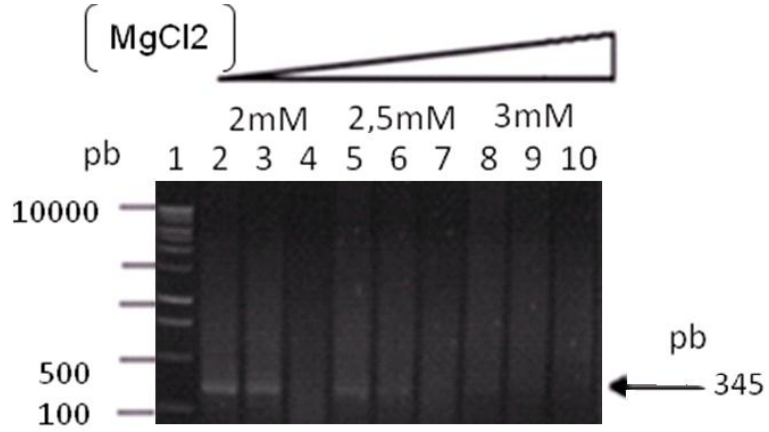


Figura 15. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores EHR16SD y EHR16SF titulando la concentración de $MgCl_2$. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores EHR16SD y EHR16SF con 100 ng de la muestra control de ADN proveniente de un canino sospechoso de infección con *A. platys*s. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100-10000pb; Carril 2: ADN de *A. platys* 44-93461 – 2 mM de $MgCl_2$; Carril 3: ADN de *A. marginale*, proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo – 2 mM de $MgCl_2$; Carril 4: H_2O, control negativo – 2 mM de $MgCl_2$; Carril 5: ADN de *A. platys* 44-93461 – 2,5 mM de $MgCl_2$; Carril 6: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo – 2,5 mM de $MgCl_2$; Carril 7: H_2O, control negativo – 2,5 mM de $MgCl_2$; Carril 8: ADN de *A. platys* 44-93461 – 3 mM de ; Carril 9: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo - 3 mM de $MgCl_2$; Carril 10: H_2O, control negativo – 3 mM de $MgCl_2$.

Si bien el ensayo con los cebadores EHR16SD y EHR16SF permitió obtener bandas de amplificación de 345 pb en concordancia con el análisis *in sílico* (figuras 4, 5, 6 y 7), todas las corridas con las muestras controles positivos, caninos y bovinos presentaron un barrido de amplificación inespecífico independientemente de las concentraciones de dNTPs y $MgCl_2$. Considerando que el propósito de la obtención de la banda espcífica de 345 pb está dirigido a su secuenciación y que la presencia de este barrido interfiere con la reacción de secuenciación, se procedió al desarrollo de un

nuevo conjunto de cebadores igualmente dirigidos al gen ARNr 16S de las Rickettsias, amplificando el gen completo.

5.4. Desarrollo y normalización del ensayo PCR-RFLP.

En este punto, se decidió diseñar unos cebadores genéricos cuyo blanco molecular fuese el gen del ARNr 16S de las Rickettsias, de forma tal que todo el gen fuese amplificado para ser secuenciado y, posteriormente, identificar polimorfismos existentes en cada secuencia del gen ARNr 16S de microorganismos dentro del orden Rickettsiales, que permitan mediante un ensayo PCR-RFLP la identificación especie-específica de *E. canis* y *A. platys*.

5.4.1. Diseño de cebadores genéricos del nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S. Análisis *in sílico*.

El diseño de cebadores genéricos para el nuevo ensayo PCR se inició con el alineamiento de las secuencias de las Rickettsias *E. chaffensis, E. canis, A. marginale, A. phagocytophilum* y *A. platys* (Tabla 5), seguido de la identificación de dominios conservados en los extremos del gen y el diseño de cebadores en estas regiones, que permitieran amplificar la totalidad del gen ARNr 16S de las Rickettsias. Para ello se usaron los programas OligoAnalizer 1.1.2 y Multalin 5.4.1.

Adicionalmente, se consideró que el valor de Tm, el % de GC y el tamaño de los cebadores fuesen óptimos, específicamente, que el Tm no excediera los 70 ºC, el % de GC oscilara entre el 50% y que el número de nucleótidos que lo conformaran fuera entre 18 y 30, según lo descrito en la literatura (Harris, 2006; McPherson y Møller, 2006). Igualmente, se procuró que el cebador sentido y el antisentido tuviesen valores similares de Tm y % de GC.

Como resultado se generaron dos cebadores denominados RYaF16S y RYaR16S. El análisis in sílico de estos cebadores, con respecto al alineamiento de las secuencias del anexo 1, demuestra que éstos amplifican una región de 1398 pb correspondientes al gen completo del ARNr 16S de las Rickettsias, como se observa en la figura 16.

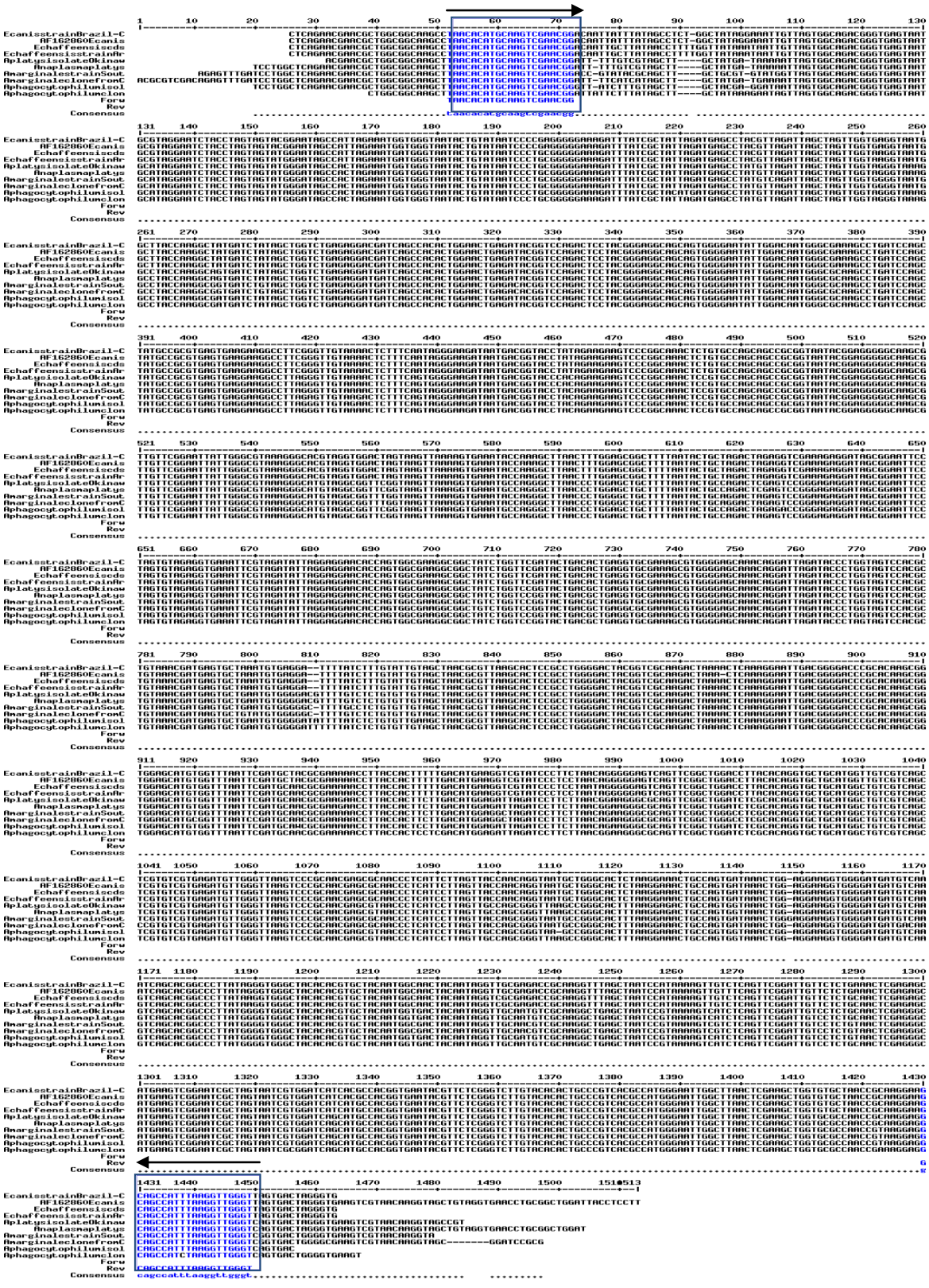


Figura 16. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis, A. platys, A. phagocitophilum, E. chaffensis y A. marginale* con los cebadores genéricos RYaR16S y RYaR16S. Las flechas muestran la ubicación donde hibridan los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S diseñados, el recuadro azul muestra el alineamiento de la secuencias en la región de hibridación de los cebadores y se muestra las 1398 pb que amplifican.

5.4.2. Normalización del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S con los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S.

Las características de Tm, % de GC, longitud y secuencia de los cebadores diseñados denominados RYaF16S y RYaR16S, se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Características de los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S para el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma.*

Blanco	Cebadores	Tm (ºC)	%GC	Ubicación Ext. 5` *	Ubicación Ext. 3` *	Nucleótidos	Secuencia	Región amplificada (pb)
ARNr16S de las Rickettsias	RYaF16S	62	47,6	52	72	21	TAACACATGCAAGTCGAACGG	1398
	RYaR16S	60	50	1430	1449	20	GCAGCCATTTAAGGTTGGGT	

* Ubicación en nucleótidos con respecto a la secuencia de *A. marginale a*islado de China (número de acceso en el GenBank HM538193.1).

Inicialmente, en la normalización de este nuevo ensayo de PCR, se determinó la especificidad de los cebadores *in sílico* y se evaluó la hibridación con el gen ARNr 16S tanto de organismos Rickettsiales como de otros micoorganismos relacionados, mediante un análisis Blast y empleando la base de datos del GenBank. Los cebadores diseñados presentaron 100% de cobertura en el dominio de la secuencia blanco con organismos Rickettsiales relacionados, como se muestra en el anexo 1.

Una vez que se determinaron todas las propiedades de los nuevos cebadores, y se conoció el tamaño esperado de la banda de amplificación con este ensayo PCR ARNr 16S convencional, se procedió a normalizar las condiciones de amplificación, considerando las condiciones de ciclado y la composición y concentración de los componentes de mezcla de reacción mostradas en las tablas 14 y 15, las cuáles fueron tomadas y modificadas de Beall y col., 2008.

Tabla 14. Condiciones del ciclado del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos diseñados RYaF16S y RYaR16S.

Ciclos	Repeticiones	Etapas	Temperatura (ºC)	Tiempo
1	1	Desnaturalización	95	5 min
2	45	Desnaturalización	94	30 seg
		Alineamiento	66	30 seg
		Extensión	72	1 min, 30 seg
3	1		72	5 min
4	1	Mantenimiento	4	-

Tabla 15. Condiciones de la mezcla de reacción del ensayo PCR ARNr 16S con los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S.

Componente	Conc. final
Tampón Taq polimerasa	1X
$MgCl_2$	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Iniciador RYaF16S	0,5 uM
Iniciador RYaR16S	0,5 uM
Enzima *Taq platinum*	1,5 U
ADN	100 ng

*Volumen de reacción 25 µL

En primer lugar se determinó la temperatura óptima de hibridación de los cebadores del ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias. Como resultado en la figura 17 podemos observar que se obtuvo la banda de amplificación esperada de 1450 pb en casi todas las temperaturas evaluadas (carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) a excepción de los 70ºC (carril 9). Sin embargo, la mejor amplificación se observó a 66ºC (carril 7), siendo ésta última la temperatura seleccionada y empleada para el resto de los ensayos.

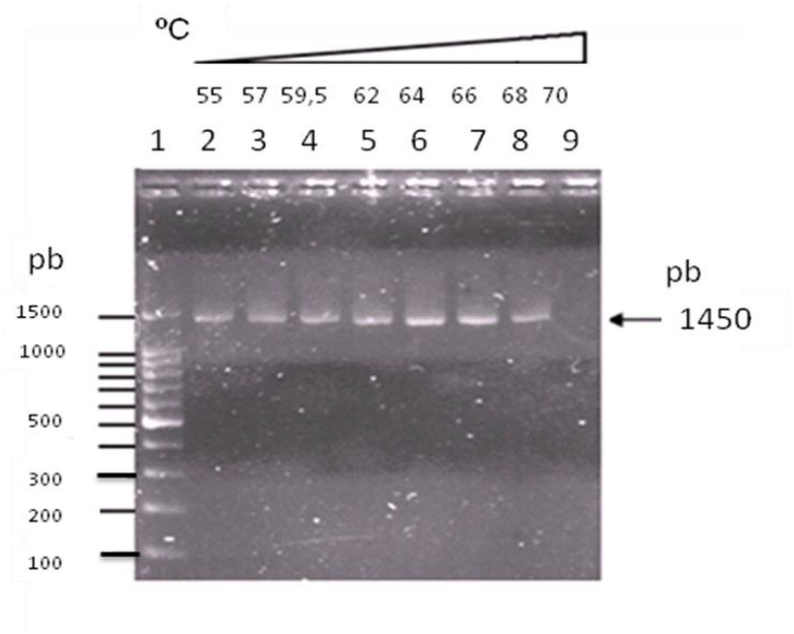


Figura 17. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores RYaF16S y RYaR16S y determinación de la temperatura óptima de alineamiento en el nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la amplificación del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S empleando los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S con 100 ng de la muestra control de ADN proveniente de un canino sospechoso de infección con *A. platys*. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100-1500pb; Carril 2: ADN de *A. platys* 44-93461 - 55°C; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461 - 57°C; Carril 4: ADN de *A. platys* 44-93461 - 59.5°C; Carril 5: ADN de *A. platys* 44-93461 - 62°C; Carril 6: ADN de *A. platys* 44-93461 - 64°C; Carril 7: ADN de *A. platys* 44-93461 - 66°C; Carril 8: ADN de *A. platys* 44-93461-68°C; Carril 9: ADN de *A. platys* 44-93461 -70 ºC.

5.4.3. Nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S

Al realizar el nuevo ensayo de PCR ARNr 16S con los cebadores RYa16SF y RYA16SR con 100 ng de ADN de cada muestra infectada con las Rickettsias de interés: *A. platys* y *E. canis*, positivas clínica y parasitológicamente, vemos en la figura 18 que los cebadores específicos diseñados en el laboratorio amplificaron una región de 1450 pb para cada una de ellas al igual que para el control positivo (carriles 2, 3 y 5). Por su parte el control ADN de humano y H_2O fueron negativos, (carriles 4 y 6 respectivamente), lo cuál corresponde con los resultados obtenidos *in sílico*.

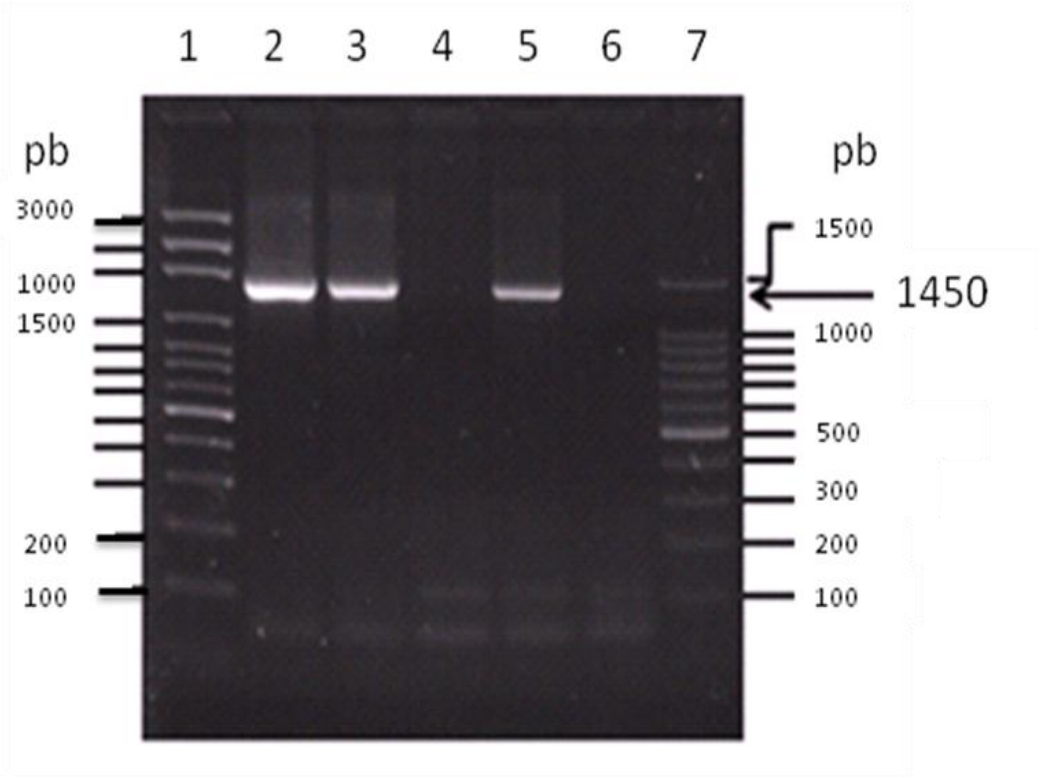


Figura 18. Evaluación de la funcionalidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYR16S del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S en muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *E. canis* y *A. platys*. Carril 1: Marcador de peso molecular Axygen 100- 3000pb; Carril 2: ADN de *A. platys* 44-93461; carril 3: ADN de *E. canis* 7-3257; Carril 4: ADN de humano sano, control negativo; Carril 5: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo*;* Carril 6: H_2O, control negativo; Carril 7: Marcador de peso molecular Promega 100-1500 pb.

5.4.3.1 Especificidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR convencional del gen ARNr 16S.

La especificidad de los cebadores diseñados se determinó empleando ADN de organismos Rickettsiales específicamente de *E. canis* y *A. platys*, además de otros organismos relacionados taxonómicamente por ser bacteris Gram-negativas como *E. coli*, *B. abortus* y *A. marginale*.

En la figura 19 podemos observar que los cebadores diseñados en el ensayo PCR ARNr 16S para las Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* amplifican el producto esperado de 1450 pb con los ADN de las Rickettsias de interés *E. canis* y *A. platys* (carriles 2 y 3) al igual que para el control positivo *A. marginale* del ensayo (carril 5), mientras que para *B. abortus* y *E. coli*, organismos relacionados taxonómicamente con estas Rickettsias no se observó amplificado alguno (carriles 6 y 8). Los resultados indican que los cebadores de este ensayo son específicos y no arrojan amplificaciones con otros microorganismos Gram- negativos.

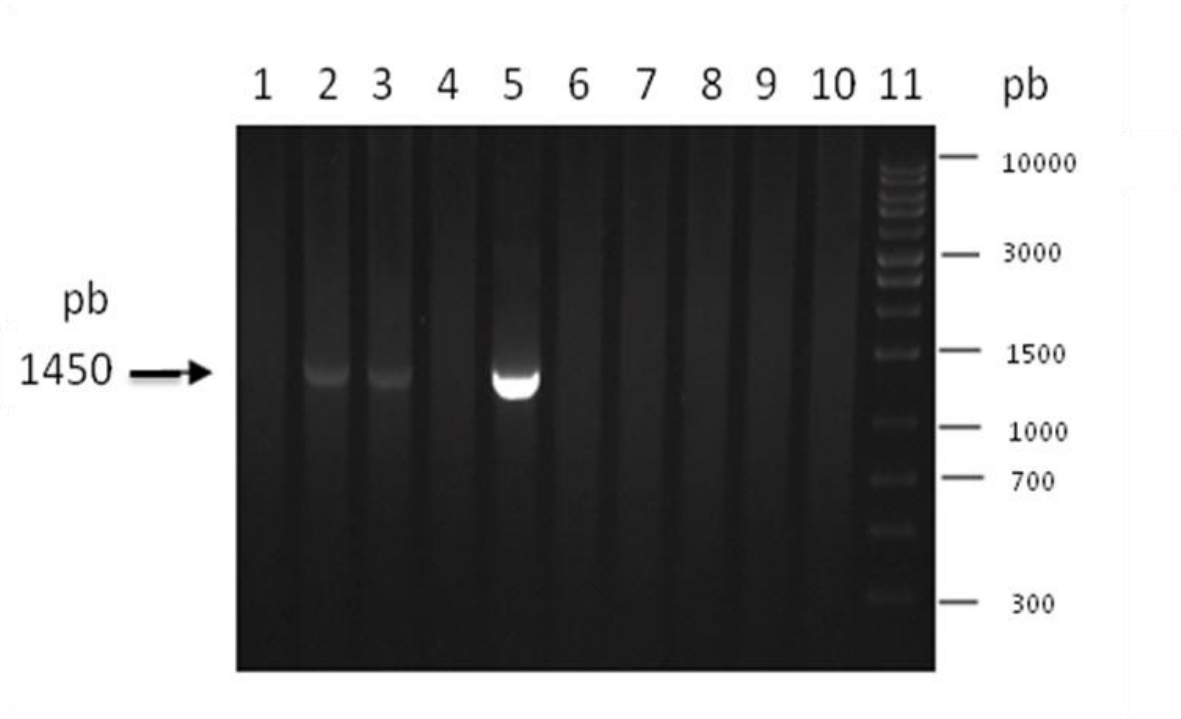


Figura 19. Especificidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores RYaF16S y RYaR16S. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo PCR ARNr 16S empleando los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S en muestras de ADN provenientes de *E. canis* y *A. platys* y de diversos organismos relacionados taxonómicamente con las Rickettsias de interés y en muestras controles. Carril 1: H_2O, control negativo; Carril 2: ADN de *E. canis* 7-3257; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461; Carril 4: ADN de canino sano, control negativo; Carril 5: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 6: ADN de *B. abortus*, cepa de vacuna; Carril 7: ADN de bovino sano, control negativo; Carril 8: ADN de *E. coli* cepa JM109; Carril 9: vacío; Carril 10: ADN de humano sano, control negativo; Carril 11: Marcador de Peso Molecular Axygen de 300- 10000pb.

5.4.3.2. Sensibilidad de los cebadores genéricos RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR convencional del gen ARNr 16S.

La sensibilidad de los cebadores RYaF16S y RYaR16S se determinó empleando las muestras de *E. canis* 26-93116 y *A. platys* 8 SH Jade. Se tomó un intervalo de 100 ng hasta 0,0001 ng tanto para *E. canis* como para *A. platys*. La figura 20, muestra la amplificación de la banda esperada de 1450 pb correspondiente al gen ARNr 16s de estos organismos Rickettsiales en los carriles 4, 5 y 6 del gel A, y en los carriles 4 y 5 del gel B, lo cual indica que la mínima cantidad de ADN que son capaces de detectar los cebadores diseñados en este trabajo de investigación (RYaF16S y RYAR16S), en el caso de *A. platys* (Gel A) corresponde a 1 ng, mientras que en el caso de *E. canis* (Gel B) es de 10 ng.

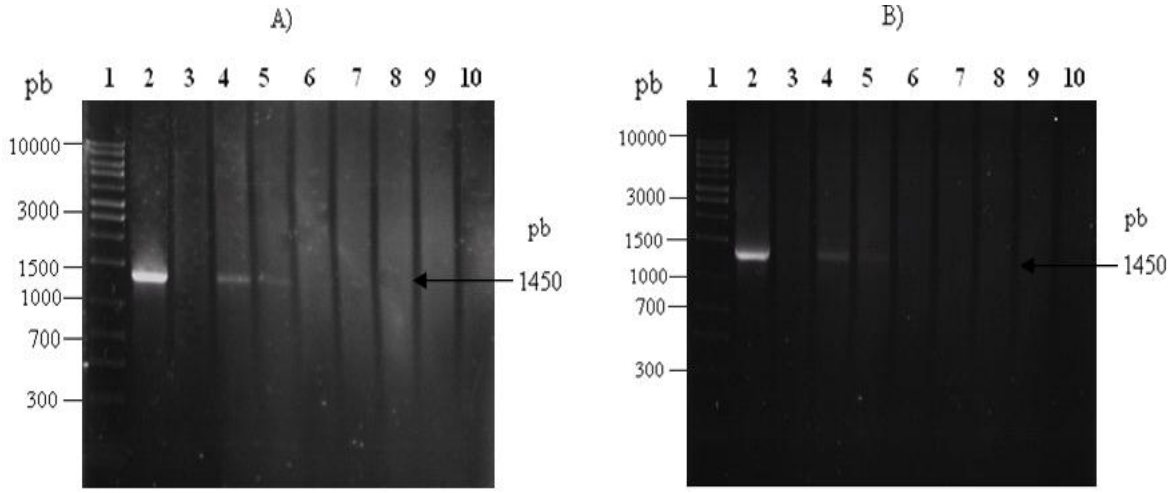


Figura 20. Sensibilidad del nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores RYaF16S y RYaR16S. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo PCR del gen ARNr 16S empleando los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S en muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *E. canis* y *A. platys*. **Gel A)** Carril 1: Marcador de Peso Molecular Axygen 300-10000pb; Carril 2: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 3: H_2O, control negativo; Carril 4: ADN de *A. platys* 8 SH Jade- 100 ng; Carril 5: ADN de *A. platys* 8 SH Jade – 10 ng; Carril 6: ADN de *A. platys* 8 SH Jade - 1 ng; Carril 7: ADN de *A. platys* 8 SH Jade - 0,1 ng; Carril 8: ADN de *A. platys* 8 SH Jade - 0,01 ng; Carril 9: ADN de *A. platys* 8 SH Jade - 0,001 ng; Carril 10: ADN de *A. platys* 8 SH Jade - 0,0001 ng/µL. **Gel B)** Carril 1: Marcador de Peso Molecular Axygen 300- 10000pb; Carril 2: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 3: H_2O, control negativo; Carril 4: ADN de *E. canis* 26-93116 - 100 ng; Carril 5: ADN de *E. canis* 26-93116 - 10 ng; Carril 6: ADN de *E. canis* 26-93116 - 1 ng; Carril 7: ADN de *E. canis* 26-93116 - 0,1 ng; Carril 8: ADN de *E. canis* 26-93116 - 0,01 ng; Carril 9: ADN de *E. canis* 26-93116 - 0,001 ng; Carril 7: ADN de *E. canis* 26-93116 - 0,0001 ng.

5.4.4. Desarrollo del ensayo PCR-RFLP sobre el gen ARNr 16S. Análisis *in sílico.*

A los fines de realizar la identificación especie-específica de muestras sanguíneas de caninos de diferentes regiones de Venezuela empleando el nuevo ensayo PCR con los cebadores genéricos RYaF16S y RYR16S, se desarrolló un ensayo PCR-RFLP en base a los polimorfismos existentes en los sitios de corte de las enzimas de restricción en las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis* y *A. platys*, que permita la identificación especie-específica sin necesidad de realizar una segunda ronda de amplificación por PCR.

Para ello se tomaron las secuencias del gen ARNr 16S de *E. canis* y *A platys* disponibles en el GenBank de las especies *E. canis* cepa Brazil-CO2 (EF195135.1) y *A. platys* aislado Okinawa (AY077619.1) respectivamente, y se realizó un análisis de restricción *in sílico* que permitiera obtener los mapas de restricción de ambas secuencias del gen ARNr 16S, empleando el programa Sequencer 4.7 Demo (figura 21 y 22)

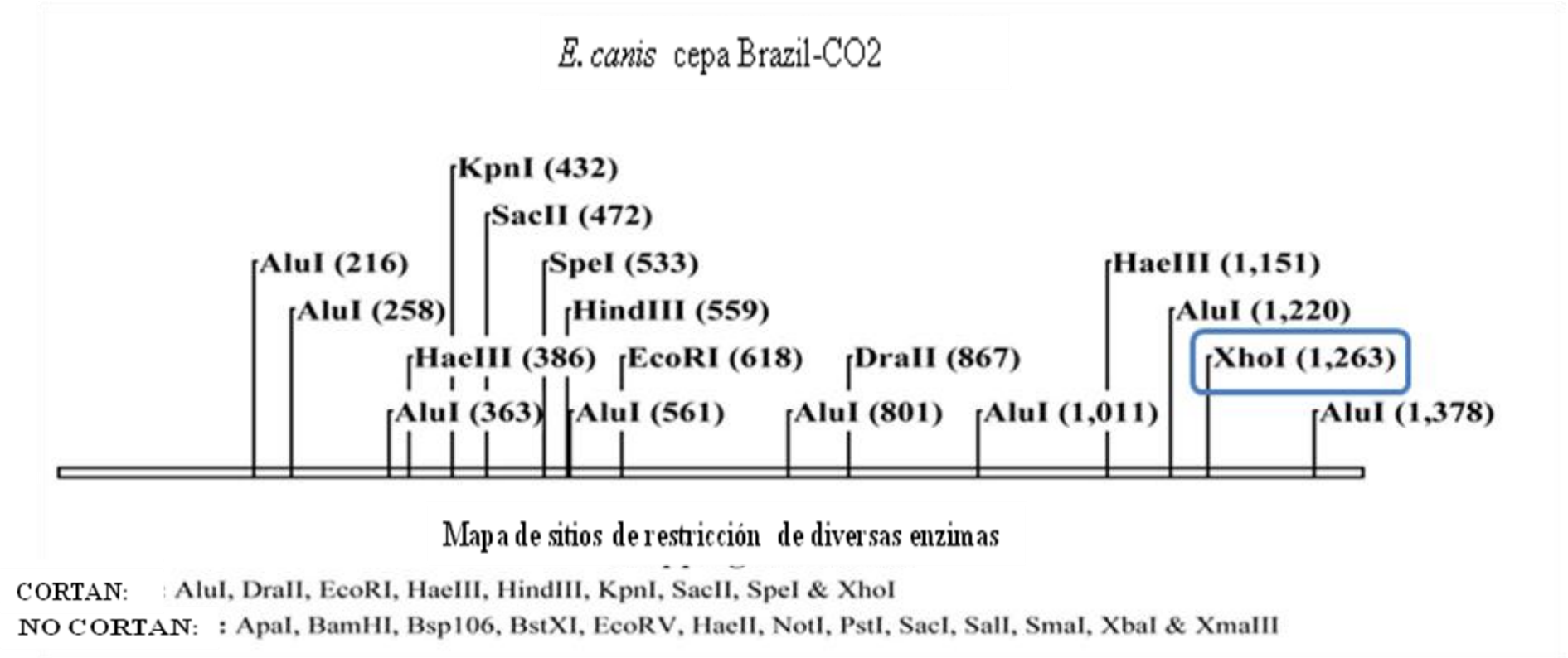


Figura 21. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* EF195135.1. En el recuadro azul se muestra la enzima seleccionada para el ensayo PCR-RFLP.

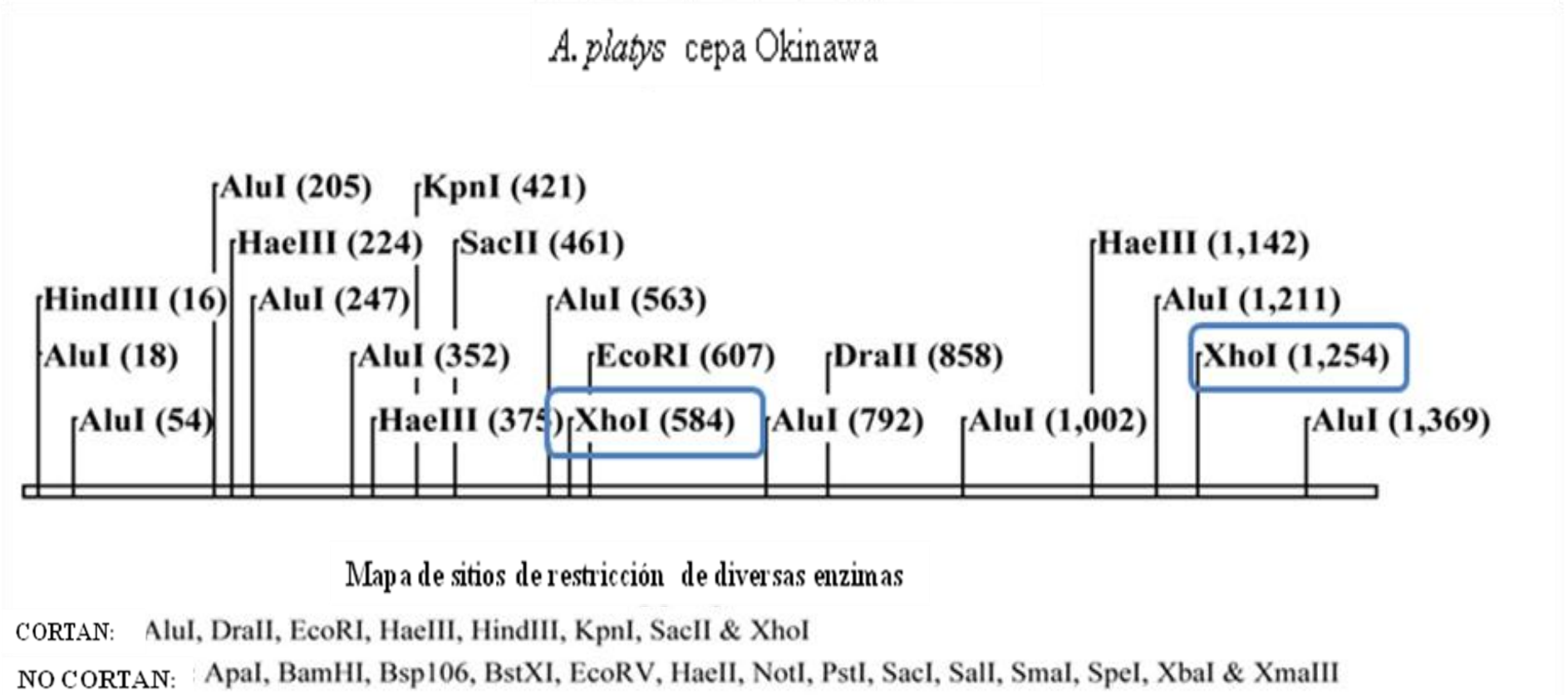


Figura 22. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *A. platys*. En el recuadro azul se muestra la enzima seleccionada para el ensayo PCR-RFLP.

La selección de la enzima del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S se basó en el número de cortes pesentes en la secuencia del gen ARNr 16S de la Rickettsias *A. platys* y *E. canis* y en la capacidad de que una sóla enzima genere patrones diferenciales para cada especie. Para ello se emplearon 22 enzimas de restricción (Figuras 21 y 22).

Bajo estas premisas, la enzima seleccionada para este ensayo PCR-RFLP fue la *XhoI*, la cuál hace un único corte en la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* en el nucleótido 1263 y dos cortes en la secuencia del gen ARNr 16S de *A. platys* en los nucleótidos 584 y 1254 respectivamente, generando dos bandas para *E. canis:* una de 1263 pb y una de 213 pb y tres bandas para *A. platys:* una de 584 pb, una de 670 pb y una de 234 pb.

5.4.4.1. Evaluación de la funcionalidad del ensayo PCR-RFLP.

En primer lugar se realizó el nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S empleando los cebadores RYaF16S y RYaR16S con las muestras de las Rickettsias: *E. canis* y *A. platys* como controles. Con este ensayo se obtuvo una banda de amplificación de 1450 pb como se muestra en la figura 18. Seguidamente se procedió a tomar una alícuota de 10 µL del producto de amplificación para realizar la digestión con la enzima de restricción *XhoI* en el tampón de digestión *Xho*I. Finalmente, luego del período de incubación de la digestión se relizó el análisis mediante la corrida electroforética de alícuotas de la digestión cuyos resultados se muestra en la figura 23.

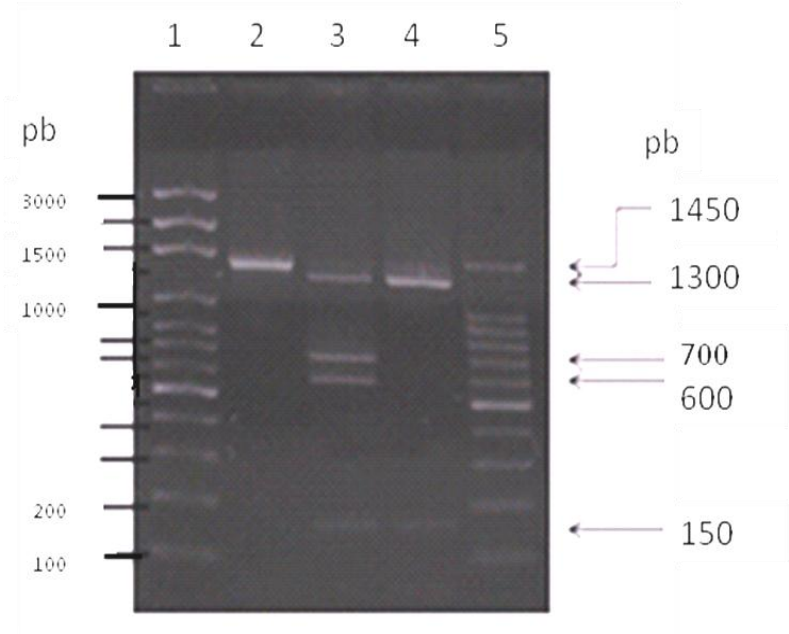


Figura 23. Funcionalidad del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S para Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de la digestión con la enzima *Xho* I en los amplicones de 1450pb asociados a las especies del orden Rickettsiales, generados con los iniciadores RYaF16S y RYaR16S en muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *E. canis* y *A. platys*. Carril 1: Marcador de peso molecular Axygen 100-3000pb; Carril 2: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control sin digerir; Carril 3: ADN de *A. platys* 44-93461*;* Carril 4: ADN de *E. canis* 7-3257*;* Carril 5: Marcador de peso molecular Promega de 100- 1500pb.

En esta figura se puede observar el análisis del polimorfismo del gen ARNr 16S con la enzima *Xho*I del amplicón de 1450 pb asociado a las especies del orden Rickettsiales generados con los iniciadores RYaF16S y RYaR16S. Como resultado, se observan las digestiones parciales con un fragmento de 1300 pb (carril 4) y fragmentos de 700 pb y 600 pb (Carril 2) y 150 pb (carriles 3 y 4) señalados con las flechas del lado derecho de la figura, esto indica que el patrón de bandas guarda relación con lo obtenido en los análisis *in sílico* realizados anteriormente (Figuras 21 y 22).

5.4.4.2. Reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP.

Con la finalidad de demostrar la reproducibilidad del ensayo PCR-RFLP, se evaluó el corte con la enzima de restricción *Xho*I seleccionada para este ensayo, sobre 9 de las 10 muestras enviadas a secuenciar a los Estados Unidos de Norteamérica. Como

resultado se pudo observar las digestiones parciales con un fragmento de 1300 pb (carriles 8, 9, 10 y 12) y fragmentos de 700 pb y 600 pb (Carriles 4, 6, 7 y 11) y 150 pb (carriles 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12) señalados con las flechas del lado derecho de la figura 24. Además de guardar relación con lo esperado en el análisis *in silico* (Figuras 21 y 22), le otorga validez a este ensayo molecular.

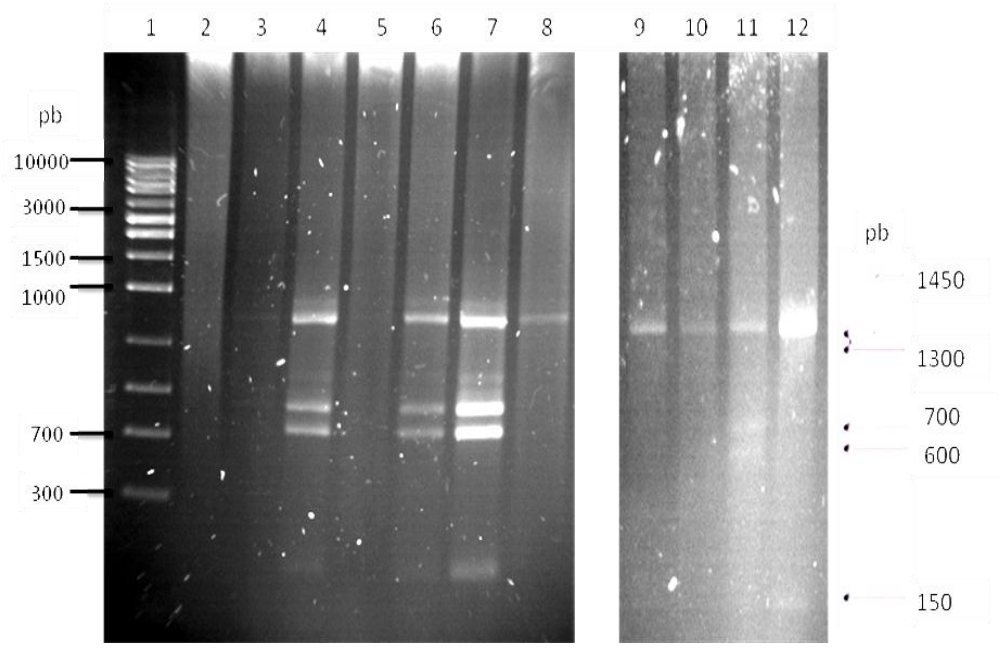


Figura 24. Especificidad del ensayo PCR-RFLP del gen ARNr 16S contra Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* con la enzima *Xho*I. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR® safe, mostrando el resultado de los cortes con la enzima *Xho*I en muestras controles de ADN provenientes de caninos sospechosos de infección por *E. canis* y *A. platys* y en muestras corrientes. Carril 1:Marcador de Peso Moleular Axygen de 300- 10000pb; Carril 2: ADN de *A. marginale* proveniente de un bovino infectado experimentalmente, control positivo; Carril 3: H_2O, control negativo; Carril 4: ADN de *A. platys* 8 SH-Jade; Carril 5: ADN de *A. platys* 8-91669; Carril 6: ADN de *A. platys* 4-89185; Carril 7: ADN de *A. platys* 10-89579; Carril 8: ADN de *E. canis* 3; Carril 9: ADN de *E. canis* 7-3257; Carril 10: 93461ADN de *E. canis* 36-Cupido; Carril 11: ADN de *A. platys* 44-; Carril 12: ADN de *E. canis* 26-93116.

5.5. Identificación de Rickettsias mediante secuenciación.

Con el uso de los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S, se realizó el ensayo PCR del gen ARNr 16S empleando un total de 10 muestras de ADN genómico de caninos de Falcón y de Zulia: 5 muestras positivas clínica y parasitológicamente a *E. canis* y 5 a *A. platys* (Ver tabla 4). Los productos fueron purificados y secuenciados en The Oncogenomics Core Facility at Sylvester Comprehensive Cancer Center, extensión de la Universidad de Miami en los Estados Unidos. Como resultado se obtuvieron 9

secuencias del gen ARNr 16S: 4 para las muestras de *E. canis* y 5 para las muestras de *A. platys*.

Estas secuencias fueron alineadas con la ayuda del programa Bioedit a fin de determinar el grado de similitud entre ellas. Las figuras 25 y 26 muestran los resultados donde se determinó que las 4 muestras de *E. canis* tenían una similitud del 99,9%. Lo mismo pudo observarse en el caso de *A. platys*, donde las 5 muestras presentaron un 100% de similitud entre sí, como puede observarse en las figuras 25 y 26. Basados en el alto grado de similitud entre las secuencias obtenidas para el gen ARNr 16S en las muestras positivas para *A. platys* y *E. canis*, se seleccionaron una secuencia de cada especie, denominados *E. canis* 1101 con 1101 pb y *A. platys* 1112 con 1112 pb para el análisis comparativo con las secuencias reportadas en el GenBank, las cuáles se muestran en los anexos 4.1 y 4.2 respectivamente.

cap M6Yare
cap M20Yare
cap M15Yare
cap M13Yare
Seqcanis

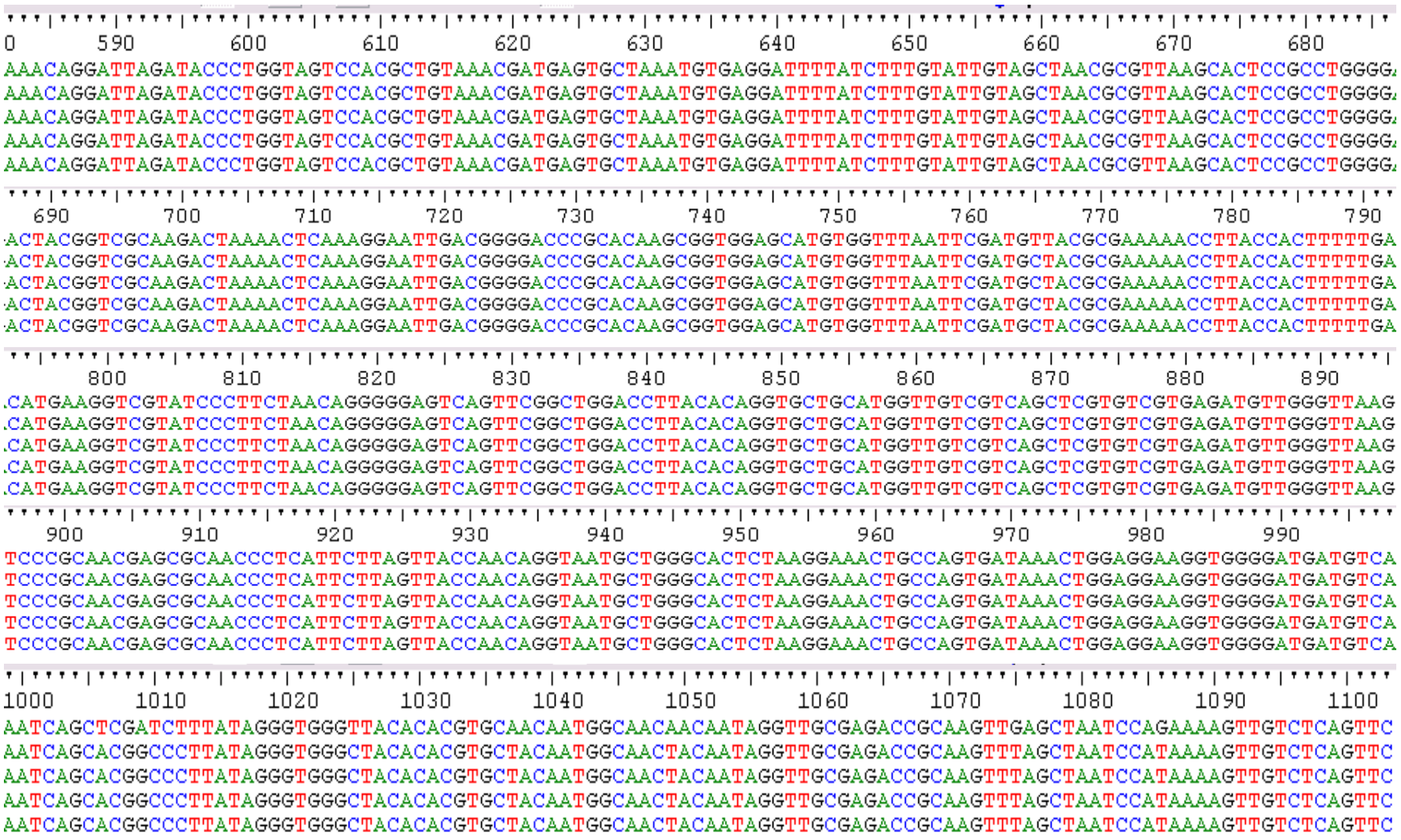


Figura 25. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas para las muestras de *E. canis.*
M6: *E. canis* 3; M13: *E. canis* 36-Cupido; M15: *E. canis* 7-3257; M20: *E. canis* 26-93116; Seqcanis: *E. canis* 1101.

cap M5Yare
cap M16Yare
cap M2Yare
cap M12Yare
cap M3Yare
Seqplatys

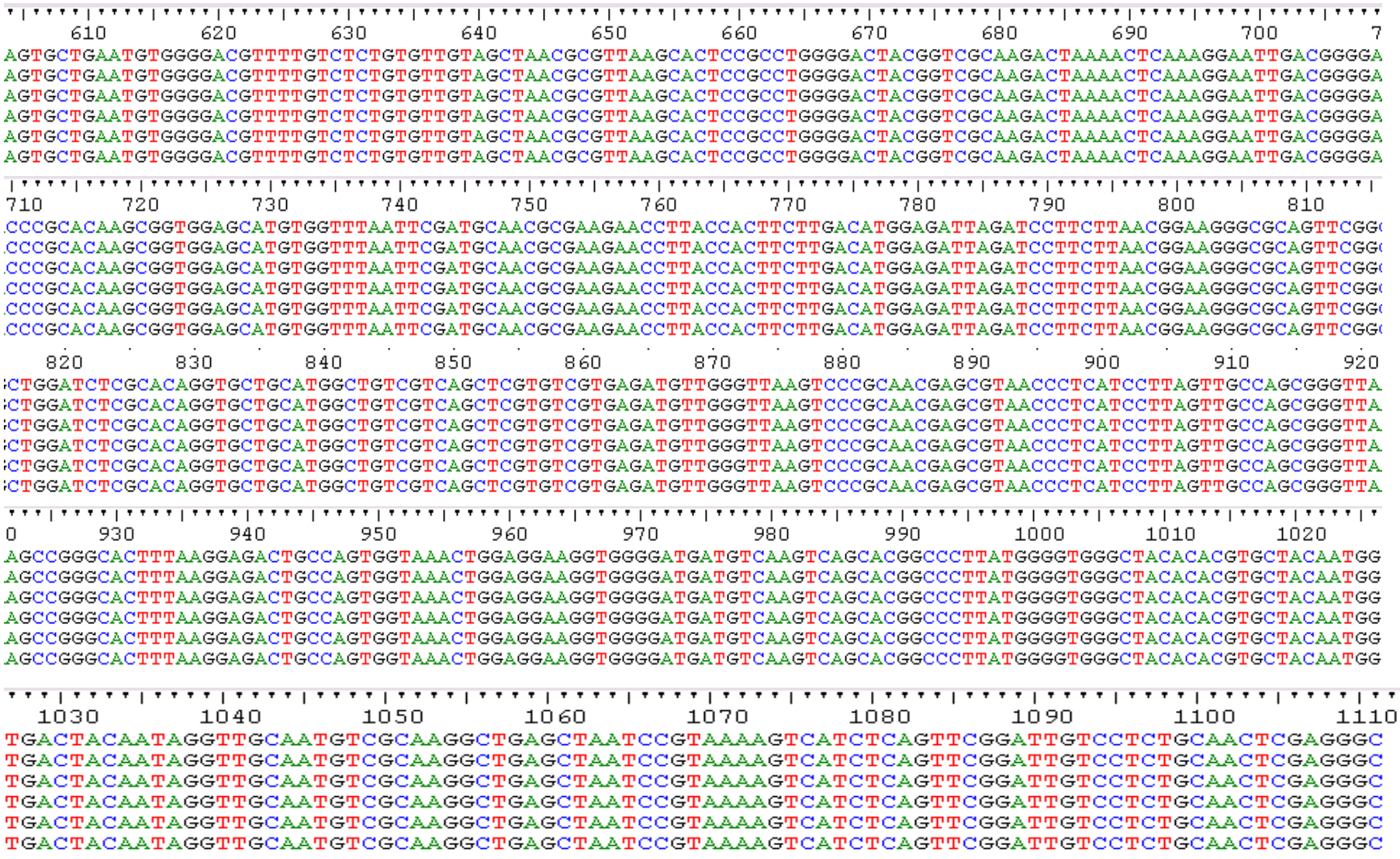


Figura 26. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas para las muestras de *A. platys*.
M2: *A. platys* 4-89185; M3: *A. platys* 8-91669; M5: *A. platys* 8-SH Jade; M12: *A. platys* A. platys 10-89579; M16: *A. platys* 44-93461; Seqplatys: *A. platys* 1112.

Una vez establecidas las secuencias del gen ARNr 16S de *A. platys* y *E. canis*, se realizó una búsqueda Blast para determinar el grado de similitud entre las secuencias obtenidad y las reportadas en el GenBank. El análisis demostró que la cepa de *E. canis* 1101 tiene un 99,8% de similaridad con los aislados de esta misma especie y entre 99-95% de similitud con otras especies de *Ehrlichia* del mundo (anexo 5). En el caso de *A. platys* 1112, se obtuvo un 100% de similaridad con los aislados de esta misma especie y entre un 98-99% de similitud con otras especies de *Anaplasma* en el mundo (anexo 6).

Finalmente, se estableció el grado de similitud entre la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *A. platys* 1112 y la reportada en la base de datos del GenBank como *A. platys* cepa Maracay incluída en el anexo 2.1 (Huang y col, 2005), a los fines de determinar si la cepa que esta infectando a los canes del país se trata de la misma cepa de Maracay o de una cepa diferente; igualmente se determinó el grado de similitud con otras 100 cepas reportadas a nivel mundial de esta especie, vistas en el anexo 6. Para ello, se emplearon los programas MultAlin 5.4.1, EMBOSS GUI y NCBI. Como resultado, se obtuvo que la cepa *A. platys* 1112 es idéntica a la reportada en Venezuela en el estado Aragua (Maracay) (Huang y col., 2005), presentando una similitud del 100%. Un grado similar similitud se obtuvo en la comparación con otros aislados de la misma especie a nivel mundial (Figura 27). No se mostró ningún polimorfismo entre estas secuencias, lo que indica que las cepas reportadas en el GenBank, al igual que la reportada hasta ahora en Venezuela y la obtenida en este trabajo de investigación son idénticas.

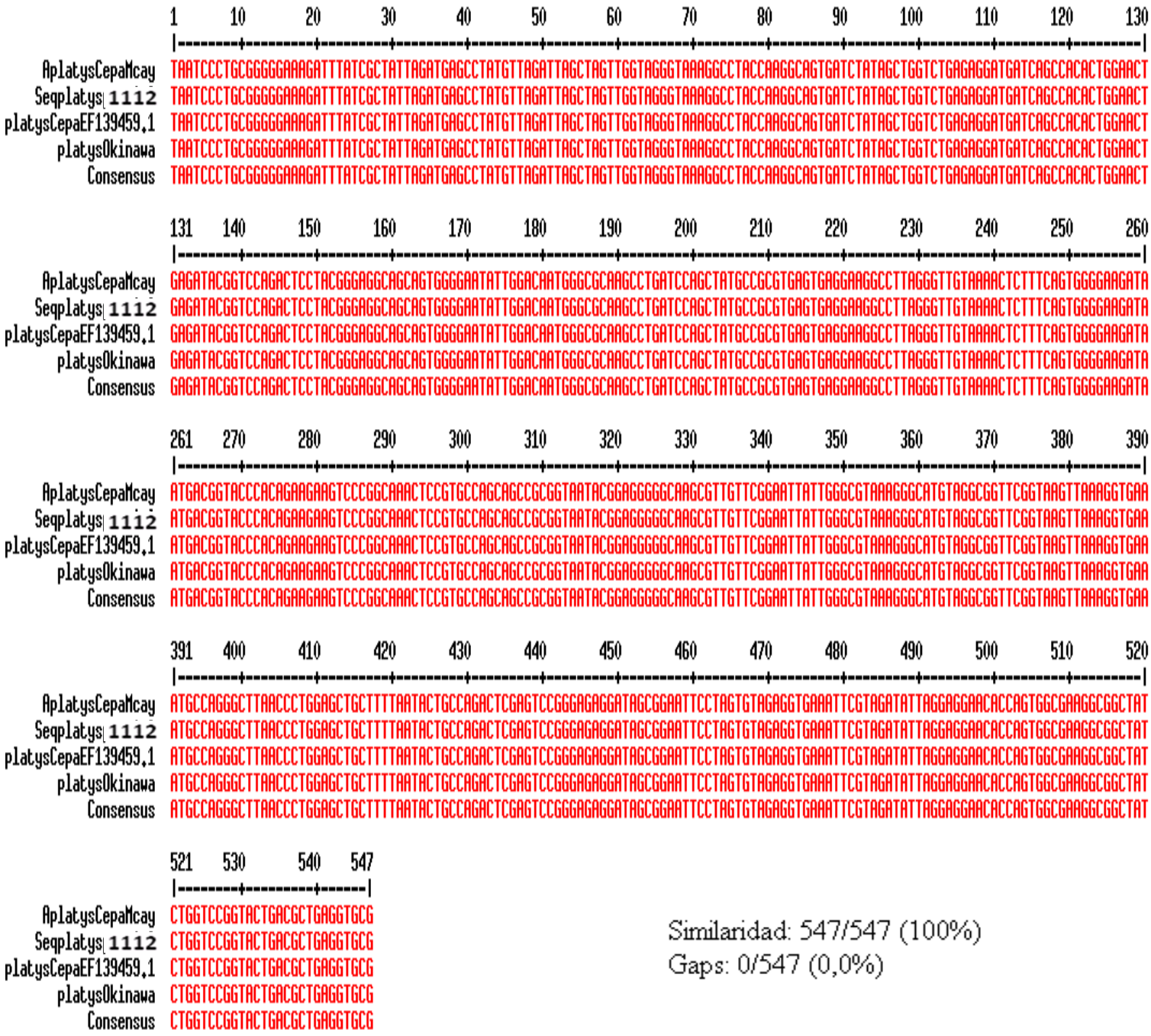


Figura 27. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes cepas de *A. platys* reportadas en el GenBank con la cepa *A. platys* 1112 obtenida en este trabajo de investigación. Se incluye la secuencia de los aislados de *A. platys* Maracay HE856819.1, A. *platys* EF139459.1 y *A. platys* Okinawa AY077619.1 en base al gen ARNr16S. Se muestra el grado de similaridad entre todas las secuencias.

Al igual que con *A. platys*, se determinó el grado de similitud entre la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* 1101 y las reportadas en la base de datos del GenBank seleccionando los aislados *E. canis* VHE (AF373612. Anexo 3.1) y *E. canis* VDE (AF373613.1. Anexo 3.2) (Unver y col, 2001), ambos basados en el gen ARNr 16S, a fin de determinar si se trata o no de la misma cepa causante de la EMC en el país. Para

ello se emplearon los programas MultAlin y EMBOSS GUI. Como resultado en este caso, se obtuvo que la cepa *E. canis* 1101 presenta un alto grado de similaridad (99,8%) con ambas cepas, sin embargo, se pudo notar la presencia de una mutación en el nucleótido 808 (TC), lo que sugiere que la secuencia obtenida en este estudio se trata de un aislado diferente a los aislados Venezolanos reportados en la base de datos del GenBank (Figura 28).

Adicionalmente, al comparar la secuencia parcial de *E. canis* obtenida con las de otras 100 cepas de diversos países reportadas en el GenBank (Anexo 5), observamos que presenta un alto grado de similitud con los aislados *E. canis* Brazil-CO2 de Brazil y *E. canis* AF162860 de China. Sin embargo, con respecto a la cepa de China mostró una mutación en el nucleótido 808 (TC), mientras que con la cepa de Brazil no mostró ninguna diferencia en la secuencia nucleotídica. Adicionalmente como se muestra en el anexo 6, presenta un alto grado de similitud con las otras 100 secuencias respecto al gen ribosomal de otras especies de *Ehrlichias*.

De igual forma se pudo observar la presencia de una deleción en la posición nucleotídica 1070 de la secuencia obtenida en este trabajo de investigación.

El análisis comparativo mediante los alineamientos está dirigido a conocer la diversidad en la secuencia del gen ARNr 16S entre los aislados venezolanos de cada una de las especies *E. canis* y *A. platys*. Los altos porcentajes de similitud demuestran que no hay variabilidad.

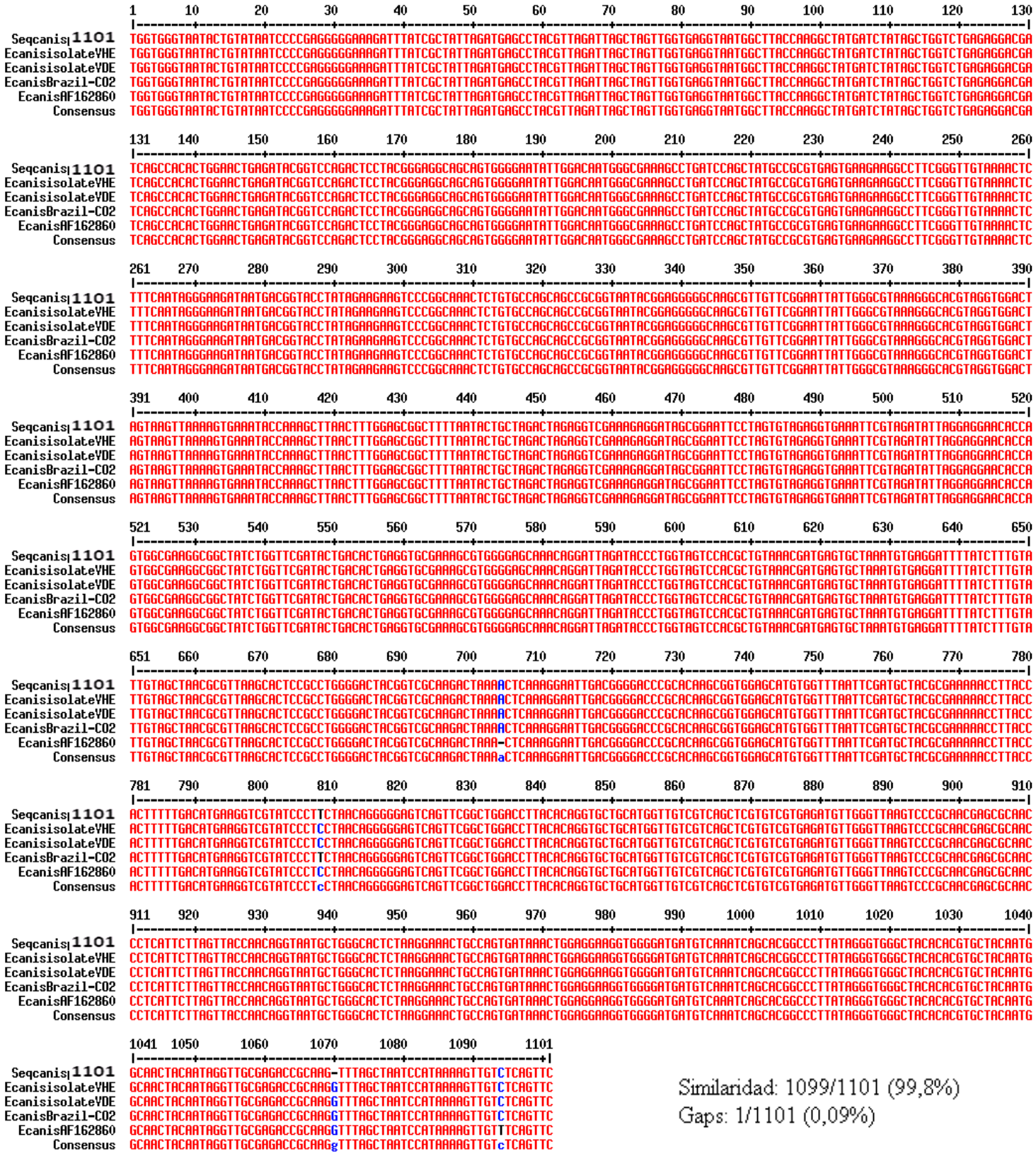


Figura 28. Alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes cepas de *E. canis* reportadas en el GenBank con la cepa *E. canis* 1101 obtenida en éste trabajo de investigación. Se incluye la secuencia de los aislados Venezolanos E.*canis* VDE AF373613.1 y *E. canis* VHE AF373612 y los aislados *E. canis* Brazil-CO2 EF195135.1, *E. canis* AF162860.1 en base al gen ARNr16S. Se muestra el grado de similaridad entre todas las secuencias.

5.5.1. Análisis de restricción *in sílico* con las secuencias obtenidas de *E. canis* y *A. platys*.

Usando las secuencias de *E. canis* 1101 y *A. platys* 1112 se realizó el análisis *in sílico* del patrón de restricción de ambas secuencias empleando el programa Sequencer 4.7 Demo. En cada caso fué posible verificar la presencia y/o ausencia del sitio de restricción de la enzima *Xho*I, que en ensayos previos se confirmó que genera patrones de restricción específicos y sencillos de evaluar (Figuras 21 y 22), justificando su selección para el desarrollo del ensayo PCR-RFLP.

En *E. canis* se observó que está ausente el sitio de corte para la enzima *Xho*I, mientras que en el caso de la secuencia de *A. platys*, se verificó la presencia de los dos cortes esperados: una en el nucleótido 433 y una en el nucleótido 1103 (Figuras 29 y 30).

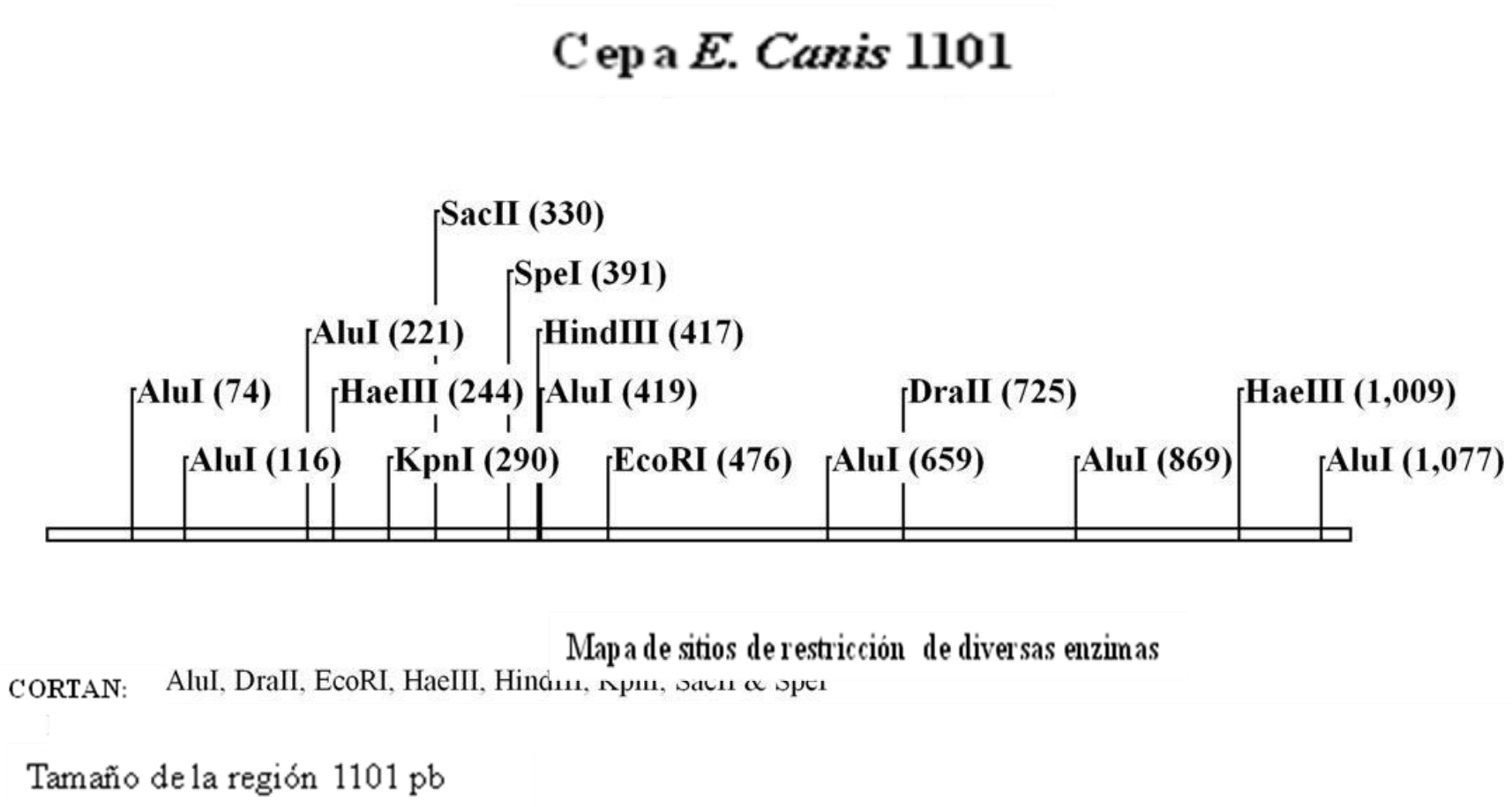


Figura 29. Mapa de restricción de la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* 1101 obtenida en este trabajo. Se indican todas las enzimas de restricción que cortan así como el nucleótido de corte con las siglas de cada enzima.

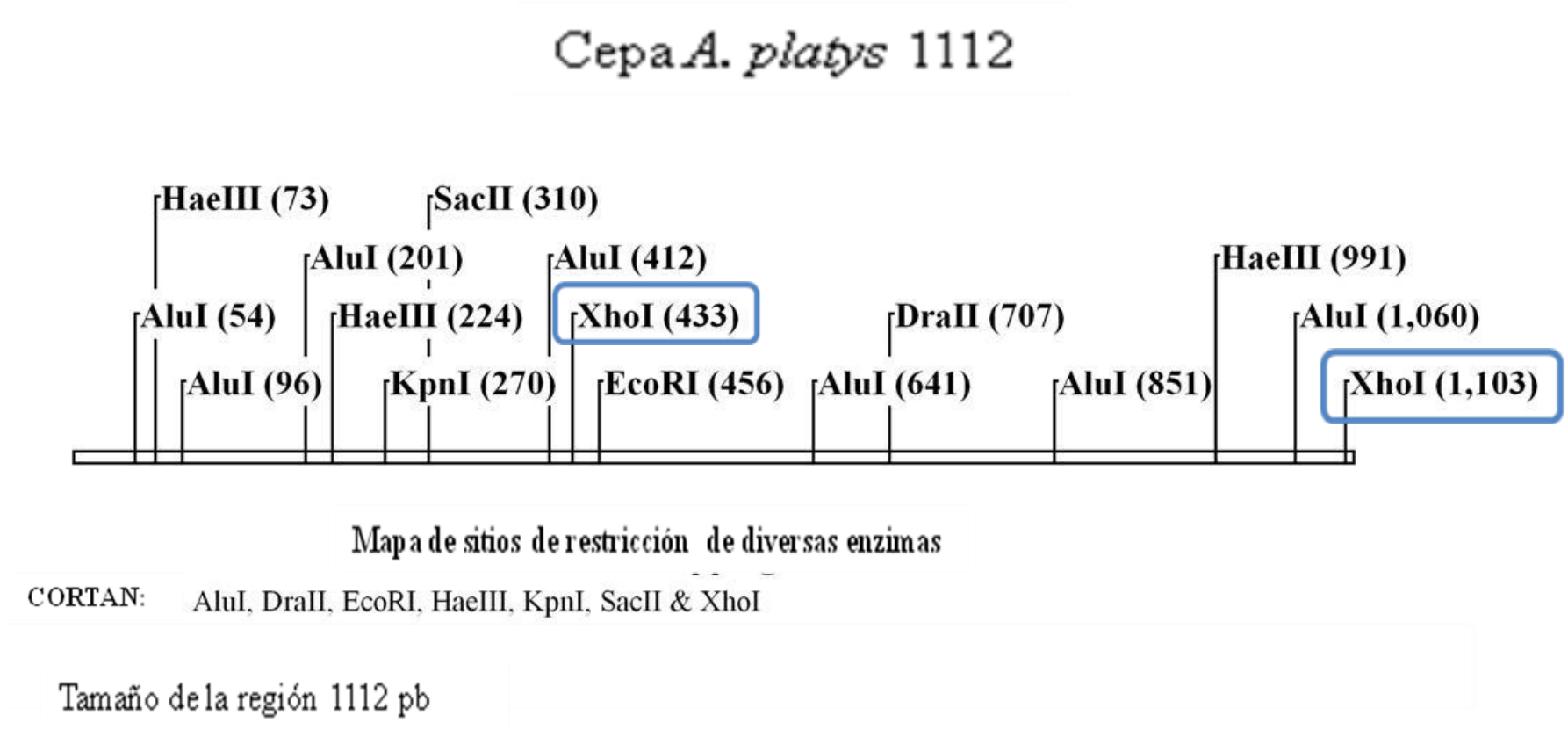


Figura 30. Mapa de restricción de la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *A. platys* 1112 obtenida en este trabajo. En el recuadro azul se muestra el sitio de corte de la enzima *Xho*I. Se indican todas las enzimas de restricción que cortan, así como el nucleótido de corte con las siglas de cada enzima.

6. DISCUSION

La EMC y la ACCT son enfermedades infecciosas causdas por las bacterias *E. canis* y *A. platys* respectivamente, que afectan principalmente a los canes y se caracterizan por generar fiebre alta, anorexia, depresión, letargia, lesiones petequiales, trombocitopenia y leucopenia (Harvey y col, 1978; Mathew y col., 2000; Harrus y col., 2001; Castro y col., 2004 Gil y col, 2008; Greene, 2008). Sin Embargo, existen reportes de infecciones en humanos (Maeda y col, 1987; Arraga-Alvarado y col, 1992; Preziosi y Cohn, 2002; Oteo y Brouqui, 2005; Stone y col, 2007; Gil y col, 2008) por lo que es considerada una enfermedad antropozoonótica la cuál requiere ser diagnosticada y estudiada, ya que constituye un problema de salud pública tanto en el mundo como en Venezuela (Skotarczak, 2003; Huang y col, 2005; Mavromatis y col, 2006; Greene y col. 2008; Gil y col, 2008).

Entre los métodos de diagnóstico más empleados para detectar estos microorganismos se encuentran la observación de signos clínicos, técnicas hematológicas como el frotis de capa blanca con coloración tipo Romanovski, citológicas, serológicas como el ELISA, Western Blot, flujo lateral e IFA, moleculares como el ensayo PCR y de aislamiento, las cuales representan instrumentos valiosos para el diagnóstico de la Ehrlichiosis y Anaplasmosis Canina (Inokuma y col, 2001; Greene y col, 2008; Harrus y col, 2011).

En Venezuela, la técnica más ampliamente usada es el frotis en capa blanca con coloración Giemsa (Gil y col, 2008) seguida del flujo lateral y por último el ensayo PCR-anidado contra diversos blancos moleculares (Huang y col, 2005; Gil y col, 2008). El frotis, a pesar de ser una prueba diagnóstica de primera opción en el diagnóstico de esta infección, no es muy sensible debido al escaso número de parásitos intracelulares durante las parasitemias. Por otra parte, las técnicas serológicas caso es el caso del IFA como la prueba serológica de diagnóstico "gold standard" tiene limitaciones porque aunque son altamente sensibles, presentan problemas para el diagnóstico en casos de infecciones mixtas con *A. platys*, *E. canis* y *A. phagocytophilum*, o en el caso de antigenicidad cruzada entre *E. canis, E. chaffensis* y *E. ewingii* (Breitschwerdt y col, 1998; Preziosi y Cohn, 2002; Bélanger y col, 2002; Greene, 2008. Por último, el PCR

permite detectar a *E. canis* y *A. platys* en la etapa aguda de la enfermedad, donde probablemente hayan títulos bajos de anticuerpos o niveles de antígenos reducidos para permitir un diagnóstico serológico temprano. Sin embargo, a pesar de ser una técnica altamente sensible y específica, su positividad en el diagnóstico es más tardío y no permite detectar a los organismos Rickettsiales en las fases crónica y sub-clínica de la infección de forma efectiva (Greene, 2008).

En el PCR como técnica molecular de diagnóstico más popular, distintos blancos moleculares han sido usados para el diagnóstico de las Rickettsias, entre ellos los genes de del operón *groESL* (Lee y col, 2003; Huang y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005), la proteína p30 (Stich y col, 2002), el gen de la citrato sintasa (*gltA*) (Inokuma y col, 2001; Inokuma y col, 2002; Parola y col, 2003; Massung y Slater, 2003) y el gen ARNr 16S (Kakoma y col, 1994; Hancock y col, 2001; Parola y col, 2003; Huang y col, 2005;Beall y col; 2008) Macieira y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005). Igualmente, se han desarrollado un gran número de pruebas de PCR con diferentes grados de discriminación a nivel de género y especie, con el gen ARNr 16S como el blanco de ADN más utilizado (Kakoma y col, 1994; Hancock y col, 2001; Parola y col, 2003; Huang y col, 2005; Beall y col; 2008) Macieira y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005).

En este estudio, escogimos para la implementación de las pruebas moleculares al gen ARNr 16S como blanco molecular, considerando que existe una amplia base de datos de estas secuencias, además de ser un gen conservado y muy antiguo que se encuentra presente en todas las bacterias y que acumula suficiente variabilidad genética que permite identificar organismos taxonómicamente muy alejados o cercanos entre sí, discriminando géneros y especies, por lo que constituye un blanco molecular ideal para realizar ensayos de diagnóstico e identificación de Rickettsias, siendo una diana universal para la identificación (Roux y Raoult, 1995;Klappenbach y col, 2001; Parola y col, 2003; Rodicio y col, 2004; Huang y col, 2005; Macieira y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005; Yu y col, 2006; Cuadra [Consulta: 16 de Enero de 2012]).

Iniciamos el estudio evaluando *in sílico* la especificidad de dos de las pruebas de PCR sobre el gen ARNr 16S, Parola y col., 2001 y Beall y col., 2008, confirmando que para las secuencias reportadas en el GenBank hasta 2012 los pares de cebadores de ambos ensayos discriminan a nivel de género y los cebadores del ensayo PCR-anidado especie- específicos discriminan a *E. canis* y *A. platys*.

Con el objetivo de lograr la identificación molecular mediante PCR y la secuenciación del gen ARNr 16S de organismos Rickettsiales en infecciones de caninos de diferentes regiones de Venezuela, nos propusimos estandarizar estos dos ensayos de PCR con discriminación a nivel de género y especie. Ambos ensayos de PCR amplifican la región variable del gen ARNr 16S de estas Rickettsias, permitiendo posteriormente en el análisis de secuencia la evaluación del polimorfismo de cepas circulantes.

La estandarización de estas dos pruebas se realizó considerando la variación de parámetros relacionados con los componentes de la mezcla de reacción y el ciclado del ensayo, en base a las condiciones óptimas descritas para cada uno de ellos (Parola y col., 2001; Beall y col., 2008).

En las figuras 12, 13, 14 y 15 se muestran los resultados obtenidos en la estandarización realizada con los cebadores empleados en el ensayo de Parola y colaboradores en el 2001. En las tablas 11 y 12 se observan las condiciones empleadas como punto de partida tanto en el ensayo para la concentración de reactivos de la mezcla de reacción, como para las temperaturas y tiempos de alineamiento. En este ensayo se varió la concentración de dNTPs de 0,2 mM a 0,8 mM, se tituló la concentración de $MgCl_2$ a 2; 2,5 y 3 mM y se crearon nuevas alícuotas de los cebadores empleados en el ensayo.

Se puede observar en todas las figuras la banda de amplificación esperada de 345pb de la secuencia parcial del gen ARNr 16S de las Rickettsias, tal como lo reportaron Parola y colaboradores en el 2001, sin embargo se apreciaba la aparición de un barrido que podía afectar potencialmente la secuenciación de dichos productos de amplificación.

A pesar de todos los cambios realizados en la mezcla de reacción, no fué posible determinar las condiciones óptimas del ensayo y eliminar el barrido observado en la corrida electroforética. Ésto pudo deberse al agua usada con el stock de los iniciadores empleados, ya que como se muestra en la figuras 12, 13, 14 y 15 el barrido estaba presente aún en los controles de contaminación con H_2O. Recordemos que el agua debe ser ultrapuura y desionizada (miliquiut) (McPherson y Møller, 2006; Assuar, [Consulta: 25 de marzo de 2012].

En las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos en la estandarización realizada con los cebadores del ensayo de Beall y colaboradores en el 2008. En las tablas 7, 8 y 9 se observan las condiciones de la mezcla de reacción y de ciclado empleadas. En este ensayo se varió la temperatura de alineamiento, la concentración del templado de ADN, la concentración de dNTPs de 0,2mM a 0,8mM, se comparó el uso de dos polimerasas diferentes y se crearon nuevas alícuotas de los cebadores empleados en el ensayo.

En este caso, no se observó en ninguna de las condiciones evaluadas la banda de amplificación esperada de 431 pb, esto pudo ser consecuencia de que la temperatura de desnaturalización inicial no era la suficiente para permitir que las hebras de ADN se separaran por completo por lo que los cebadores no se anclaron al blanco esperado, también pudo ser una consecuencia directa del número de ciclos empleados en el ensayo, ya que sólo se usaron 40 (Beall y col., 2008), mientras que en el ensayo reportado Parola y col., 2001 se usaron 45 ciclos, lo que pudo haber influído en la fase de extensión de la polimerasa (McPherson y Møller, 2006).

Sin embargo, en el análisis *in silico* de los cebadores genéricos de este ensayo (GEPs y GEPas) se puede observar, en comparación a los cebadores empleados por Parola y colaboradores en el 2001, que amplifican una región con alta variabilidad entre los nucleótidos 74 y 103 del gen ARNr 16S. Adicionalmente, los cebadores especie-específicos *E. canis*-s/*A. platys*-s/SEPas mostraron ser específicos para cada especie obteniendo dos amplificados de diferentes tamaños en cada caso (ver figuras 5y 6), permitiendo discriminar a nivel de especie las muestras evaluadas, lo que hace de este ensayo PCR-anidado ARNr 16S una poderosa herramienta para la identificación especie-específica de las Rickettsias.

A pesar de haber evaluado diversos parámetros en los dos ensayos antes mencionados, no se logró normalizar adecuadamente ninguno de ellos: en el ensayo de Parola y col., 2001 no se logró eliminar el barrido generado en la corrida electroforética, y en el ensayo de Beall y col., 2008 no se logró obtener el amplicón esperado durante la primera ronda de amplificación del PCR con los cebadores genéricos, el cuál es de gran importancia observar para poder pasar a la segunda ronda de amplificación con los cebadores especie-específicos, ya que suele haber poca cantidad de ADN de las Rickettsias de interés en el ADN genómico de las muestras evaluadas, por lo que el bajo

número de ciclos del ensayo y la baja concentración del ADN blanco influyó en el ensayo (Resultados facilitados por la profesora Omaira Parra de la FCV-LUZ, no publicados).

En consecuencia, se decide diseñar y analizar *in sílico* unos nuevos cebadores avanzando con los objetivos específicos planteados. Los cebadores empleados para el nuevo ensayo PCR fueron diseñados en base al alineamiento de secuencias del gen ARNr 16S de los organismos Rickettsiales de cepas disponibles en la base de datos del GenBank, mostradas en la tabla 6, ya que como se mencionó anteriormente, este gen es el más ampliamente usado como blanco molecular en los ensayos PCR para el diagnóstico e identificación de estos microorganismos, ya que esta región presenta regiones variables distintivas en las cepas de las distintas Rickettsias empleadas para los alineamientos (Figura 16). (Kakoma y col, 1994; Hancock y col, 2001; Parola y col, 2003; Huang y col, 2005; Beall y col; 2008) Macieira y col, 2005; Oteo y Brouqui, 2005). Para ello se emplearon los programas bioinformáticos OligoAnalizer 1.2, OligoExplorer 1.2 y Multalin 5.4.1.

Los cebadores diseñados, denominados RYaF16S y RYaR16S amplifican una región de 1450 pb, abarcando el gen ARNr 6S completo. Fueron empleados en el nuevo ensayo PCR del gen ARNr 16S y se demostró que son capaces de detectar de forma específica a microorganismos Rickettsiales como se muestra en la figura 16 y el anexo 1. El empleo de estos iniciadores le otorga al ensayo PCR una alta sensibilidad y especificidad, por lo que pueden ser usados en el diagnóstico de las Rickettsias, en conjunto con la secuenciación. Es importante señalar, que el cebador sentido diseñado para este ensayo, se encuentra incluido dentro del cebador sentido descrito en Beall y col., 2008, pero con un tamaño menor, y sin incluir bases degeneradas.

Normalizamos las condiciones óptimas del nuevo ensayo PCR ARNr 16S (tablas 14 y 15 y figuras 17 y 18), logrando detectar la infección por *E. canis* y *A. platys* en 10 muestras de caninos venezolanos.

La temperatura óptima de alineamiento de los cebadores de este ensayo fue de 66ºC (Figura 17), ya que a esta temperatura se ve favorecida la amplificación del blanco de interés, obteniéndose una banda de amplificación más fuerte en comparación al resto de las temperaturas empleadas. Sin embargo temperaturas empleadas por debajo de los

66ºC también mostraron la banda de amplificación esperada, lo que demuestra que estos cebadores son bastante estables. A los 70 ºC no se obtuvo el amplificado, ya que a altas temperaturas ya no hay buen funcionamiento de los cebadores y por ende no se da la amplificación (Assuar, [Consulta: 25 de marzo de 2012]).

Es importante señalar que como el ensayo funcionó con las condiciones descritas en las tablas 14 y 15, no fue necesario estandarizar las condiciones óptimas del mismo variando parámetros relacionados con la mezcla de reacción o con el ciclado del ensayo.

En cuanto a la determinación de la cantidad óptima de ADN del ensayo, vemos que todos han sido realizados con 100 ng, obteniendo la banda de amplificación esperada de 1450 pb (Figuras 17, 18, 19 y 20). Esto guarda relación a lo reportado por diversos autores, que señalan usar altas concentraciones de ADN genómico para sus ensayos PCR en base al gen ARNr 16S de estas Rickttsias (Iqbal y col, 1994; Breitschwerdt y col, 1998; Huang y col, 2005).

La especificidad del ensayo fue determinada empleando muestras de ADN de bacterias Gram-negativas (*B. abortus, E. coli*), ADN de humano y de los controles positivos y negativos respectivos (Ver tabla 4). Este ensayo como se muestra en la figura 19, demostró que los cebadores son específicos para el ADN de las Rickettsias, ya que se obtuvo la amplificación exclusiva de la banda de 1450 pb en las muestras controles de *A. marginale, E. canis* y *A. platys*, y no en las muestras de otras bacterias Gram-negativas.

Por su parte, al determinar la sensibilidad del ensayo PCR respecto al gen ARNr 16S con los cebadores diseñados RYaF16S y RYaR16S, podemos observar en la figura 20, que la cantidad mínima de ADN que es capaz de detectar estos cebadores en una infección con *A. platys* es de 1 ng, mientras que en el caso de *E. canis*, son capaces de detectar una mínima concentración de 10 ng. La cantidad de ADN que es capaz de detectar el ensayo depende en gran medida de la parasitemia de cada una de las muestras, ya que en altos niveles de parasitemia se espera reconocer una menor cantidad de ADN y viceversa, debido a que en las muestras de ADN genómico están presentes tanto ADN del perro como ADN de la Rickettsia, y mientras mayor es la parasitemia con estos microorganimos, mayor será la cantidad de su ADN presente en la muestra y

por ende, será reconocido más fácilmente en pequeñas cantidades por el ensayo PCR. Bajos niveles de la misma conducirán al uso de mayores cantidades de ADN.

Diversos autores han empleado el método de amplificación por PCR del gen completo del ARNr 16S de estas Rickettsias de interés seguido de la secuenciación para la identificación de organismos Rickettsiales (Suto y col, 2001; Unver y col, 2003; Aguirre y col, 2004; Eddlestone y col., 2007). En este estudio 9 de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de *E. canis* y *A. platys* (5 de *A. platys* y 4 de *E. canis*) fueron obtenidas mediante la secuenciación automatizada. Estas secuencias fueron alineadas entre sí para determinar su grado de similitud, y con secuencias del gen ARNr 16S de otras cepas Ehrlichiales disponibles en el GenBank.

Adicionalmente, como se observa en las figuras 25 y 26, se determinó que las 4 muestras de *E. canis* tenían una similitud de 99,9%, reflejando que se trataban de la misma cepa. Lo mismo pudo observarse en el caso de *A. platys*, donde las 5 muestras presentaron un 100% de similitud entre sí, reflejando que pertenecían a la mima cepa, por lo que se tomó una sola secuencia de cada Rickettsia para los alineamientos con otras cepas de estos microorganismos.

Las similitud en la secuencia de nucleótidos entre la secuencia del gen ARNr 16S de *A. platys* 1112 obtenida en el presente estudio y otros cepas de este microorganismo se muestra en el anexo 6 y puede ser observada en la figura 27. Inicialmente, al comparar la secuencia obtenida con la secuencia Venezolana reportada *A. platys* Maracay (Huang y col, 2005) vista en el anexo 2.1, vemos que presentan un porcentaje de similitud del 100%, lo que indica que la cepa obtenida en el presente estudio es la misma reportada anteriormente por Huang y colaboradores (2005) como agentes causales de la ATCC en los canes del país. Igualmente el grado de similitud con otras cepas de este microorganismo fue del 100%, indicando que a su vez, las cepas encontradas de *A. platys* en Venezuela en relación a las que se han reportado en otros países es la misma.

Por su parte, el recuadro donde observamos el grado de similitud entre la secuencia del gen ARNr 16S de *E. canis* 1101 obtenida en este estudio y otras cepas de este microorganismo se muestra en el anexo 5 y puede ser observada en la figura 28. Inicialmente, al comparar la secuencia obtenida con las secuencias de las cepas

Venezolanas *E. canis* VDE (Unver y col, 2001) y *E. canis* VHE (Unver y col, 2001) vistas en los anexos 3.1 y 3.2, presentan un alto porcentaje de similaridad entre sí, sin embargo, la secuencia obtenida difiere en un nucleótido en la posición 808 con ambas secuencias venezolanas. Esta mutación, indica que la secuencia obtenida en este trabajo de investigación es diferente a las reportadas hasta ahora en Venezuela. Igualmente, difiere en un nucleótido en la misma posición nucleotídica con la cepa *E. canis* AF162860 de China (Pan y col, 1999, trabajo no indexado). Este bajo nivel de polimorfismo entre las cepas de *E. canis* también ha sido obtenida por otros autores (Unver y col, 2001; Aguirre y col, 2004).

Posteriormente, al comparar la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa de *E. canis* 1101 reportada en el presente estudio con otras cepas reportadas en el GenBank (Figura 27, anexo 5), ésta mostró un alto porcentaje de similaridad (99,8%) con la secuencias del gen ARNr 16s de la cepa *E, canis* Brazil- CO2 (De Paiva y col, 2007), además no se observaron mutaciones entre ambas secuencias en el alineamiento, aunque si la presencia de una deleción en la posición nucleotidica 1070, demostrando que se trata de una cepa muy similar a la obtenida en este trabajo de investigación. Es importante señalar que De Paiva y colaboradores (2007) señalan que esta cepa Brasileña es la misma que genera la Ehrlichiosis en humanos en Venezuela, sin embargo este estudio demuestra que en los canes de Venezuela también está presente la infección Ehrlichial con esta cepa. Como se muestra en el anexo 5, un alto grado de similaridad con otras cepas de esta especie es reflejado, ya que a pesar de que muchas de las cepas de *E. canis* descritas actualmente tienen muchos orígenes geográficos diferentes, la mayoría de ellas están muy estrechamente relacionadas en base a la secuencia del gen ARNr 16S, así lo señalan Uilenberg y colaboradores (2004).

Cabe destacar que la mutación y la deleción encontrados en la secuencia consenso establecida para *E. canis* en este trabajo de investigación también estan presentes en cada uno de los 4 aislados secuenciados de esta Rickettsia (ver figura 25), por lo que se consideran importantes características para señalar que esta cepa de *E. canis* es diferente a las reportadas hasta ahora en el país.

Un aporte importante de este trabajo de investigación es el desarrollo un ensayo de PCR-RFLP, el cuál permitiera discriminar entre la infección con *E. canis* y *A. platys* aplicado en muestras sanguíneas de caninos de Zulia y Falcón de forma rápida, sencilla

y económica. Fue posible identificar que 4 muestras de Zulia estaban infectadas por *A. platys* (ver figura 24) y 4 muestras estaban infectadas por *E. canis* (ver figuras 23 y 24), mientras que en Falcón la única muestra evaluada estaba infectada por *E. canis* (ver figura 24).

La técnica del PCR-RFLP mediante el empleo de la enzima *XhoI* mostró ser bastante específica hacia las secuencias del gen ARNr 16S de las Rickettsias *A. platys* y *E. canis*, permitiendo discernir entre ambas especies generando un patrón de cortes diferente en cada caso como se muestra en la figura 23, relacionándose con lo obtenido mediante el análisis *in sílico* de los mapas de restricción de las secuencias del gen ARNr 16S de ambos organismos (Figuras 21 y 22). Adicionalmente, estos resultados coinciden con otros reportes, donde confirman que el análisis de restricción con la enzima *XhoI* sobre amplicones obtenidos mediante PCR convencional dirigido al gen del ARNr 16S, permite identificar de forma específica organismos del género *Ehrlichia* (Inokuma y col., 2001). Es importante acotar que pueden usarse otras enzimas de restricción en este ensayo, que igualmente permiten obtener un patrón de bandas característico de cada especie como se muestra en las figuras 21 y 22, hecho que han demostrado otros autores (Dawson y col., 1996b; Inokuma y col., 2001) quienes emplearon el ensayo PCR dirigido al gen ARNr 16S y los genes gltA y groESL, sin embargo, la enzima seleccionada en este ensayo genera el patrón de cortes más sencillo para ser evaluado mediante el empleo de geles de agarosa, permitiendo que el uso de esta herramienta molecular garantice practicidad y rapidez en el diagnóstico e identificación de Rickettsias.

Adicionalmente, como se muestra en la figura 24, se comprobó que el ensayo es reproducible, ya que permitió confirmar la infección por *E. canis* y *A. platys* en algunas de las muestras enviadas a secuenciar a los Estados Unidos de Norteamérica. Igualmente se verificó la presencia de los sitios de corte de la enzima *Xho*I sobre las secuencias de *E. canis* 1101 y *A. platys* 1112 en mapas de restricción generados del análisis *in silico* (Figuras 29 y 30)), obteniendo que en el caso de *A. platys*, se encuentran las dos regiones de corte reconocidas por esta enzima como era los esperado, sin embargo, en *E. canis*, no se observo el único sitio de corte esperado. Esto es consecuencia de los errores en la secuenciación arrojados en los extremos de las secuencias reflejándose en la superposición de picos en los fentográmas, y el sitio de

corte esperado es en la región 5`terminal de la secuencia del gen ARNr de ésta Rickettsia. Además, la secuencia obtenida de *E. canis* es 11 nucleótidos más corta que la generada para *A. platys* (1101 pb y 1112 pb respectivamente).

El desarrollo de las técnicas moleculares de PCR con los cebadores RYaF16S y RYaR16S y el PCR-RFLP nos permitió identificar las especies de organismos Rickettsiales presentes en las muestras evaluadas como cepas venezolanas y compararlas con las encontradas en la base de datos del GenBank, con lo que de forma concreta podemos decir que en Venezuela las especies de *A. platys* y *E. canis* circulantes son las mismas y que a su vez, ambas presentan homología con los aislados reportados en otras partes del mundo (ver anexos 5 y 6). Esto nos indica que los estudios de estas Rikettsias deben estar enfocados hacia el hecho de que son bacterias antropozoonóticas y verificar que así como se trata de los mismos patógenos en perros, también estas mismas cepas pueden ser los agentes causales de la Ehrlichiosis en humanos.

Igualmente, representan una valiosa herramienta en el caso de encontrar infecciones Rickettsiales en humanos, ya que se podrá diagnosticar e identificar estos microorganismos de forma rápida, lo que permitirá la aplicación del tratamiento oportuno, minimizando los riesgos del avance de esta infección.

Es muy importante destacar que el desarrollo del ensayo PCR-RFLP ARNr 16S hecho en el presente trabajo de investigación representa un importante aporte para la investigación al respecto de las Rickettsias *A. platys* y *E. canis* en Venezuela, ya que hasta ahora no se ha implementado esta técnica en el diagnóstico e identificación de estos microorganismos Rickettsiales ni el país ni en Latinoamérica, siendo pioneros en la identificación de estas Rickettsias mediante el empleo de este ensayo molecular. Adicionalmente, representa un ensayo que generará menores costos en los laboratorios de diagnóstico clínico, veterinario y de investigación.

7. CONCLUSIONES

- Los ensayos reportados en la literatura por Parola y col., 2001 y Beall y col., 2008 en base al gen ARNr 16S para el diagnóstico de Rickettsias, demostraron un alto grado de especificidad y sensibilidad *in sílico*, sin embargo, su implementación en el presente trabajo de investigación no fue exitosa por problemas durante la normalización.

- Se diseñó y se realizó el análisis *in sílico* de unos nuevos cebadores mediante el empleo de herramientas bioinformáticas (OligoAnalizer 1.2, OligoExplorer 1.2, Multalin 5.4.1) para un nuevo ensayo PCR en base al gen ARNr 16S, capaces de amplificar la totalidad de dicho gen.

- Los cebadores diseñados denominados RYaF16S y RYaR16S amplifican la totalidad del gen ARNr 16S de diversos organismos Rickettsiales de forma específica.

- El ensayo de PCR del gen ARNr 16S empleando los cebadores RYaF16S y RYaR16S resultaron eficientes para determinar la presencia de una infección Rickettsial en el ADN genómico de muestras sanguíneas de perros positivas por síntomas clínicos y frotis de capa blanca.

- El análisis comparativo de las secuencias parciales de las Rickettsias *A. platys* y *E. canis* de muestras sanguíneas de caninos, amplificadas mediante el nuevo ensayo PCR con los cebadores RYaF16S y RYaR16S y las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, confirmó la presencia de estos microorganismos en dichas muestras.

- La secuenciación permitió confirmar el diagnóstico especie- específico en las muestras de canes evaluadas.

- La infección presente en la muestra sanguínea proveniente del estado Falcón es originada por una cepa circulante de E. canis.

- La infección presente en las muestras sanguíneas de canes provenientes del estado Zulia, es originada por cepas circulantes tanto de *E. canis* como de *A. platys*, siendo la cepa de *E. canis* igual a la encontrada en Falcón.

- El análisis de las secuencias reportadas para el gen ARNr 16S en el GenBank de diversos organismos Rickettisales y su posterior comparación con las secuencias obtenidas, indican con un 100% de similitud que la cepa de *A. platys* es igual a la reportadas hasta ahora en Venezuela (cepa Maracay) y a nivel mundial, mientras que la cepa de *E. canis*, con 99,8% de similitud, indica que se asemeja a las reportadas con anterioridad en el país (cepas VDE y VHE) y con las cepas de esta misma especie en otras partes del mundo.

- El empleo de un ensayo PCR-RFLP en base al gen ARNr 16S de organismos Rickettsiales, resulta una prometedora técnica molecular que puede ser empleada para el diagnóstico e identificación de organismos de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* tanto en caninos como en humanos, de forma rápida y sencilla con el uso de la enzima de restricción *XhoI*, sin necesidad de emplear dos rondas de amplificación por PCR.

8. RECOMENDACIONES

- Para mejorar los resultados obtenidos, se recomienda seguir normalizando los ensayos de Parola y colaboradores, 2001 y Beall y colaboradores, 2008, con la finalidad de conocer las condiciones óptimas para el desarrollo d estos ensayos que son bastante útiles para el diagnóstico e identificación de Rickettisas.

- Igualmente, se recomienda ampliar el número de muestras empleadas en los ensayos para secuenciación, además de incluir muestras de un mayor número de estados del país para verificar que las especies de *E. canis* y *A. platys* que circulan como patógenos de perros son las mismas que ya han sido reportadas en el GenBank, además de evaluar la potencialidad del uso de este ensayo como prueba de diagnóstico en los laboratorios de investigación y de diagnóstico

9. BIBLIOGRAFÌA

1. Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C. y Wilson, K.H. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new specie associated with human Ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **29(12)**: 2838-2842.

2. Abarca, K., López, J., González, P., Dabanch, J., Torres, M., Solari, V. y Perret, C. 2008. Evidencia seroepidemiológica de exposición humana a *Anaplasma* sp en Santiago, Chile. Rev. Chil. Infect. **25(5)**: 358-361.

3. Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusategui, I., López, L., Rodríguez-Franco, F., Luaces, I. 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. Vet. Parasitol. **125**: 365-372.

4. Anaya, E., Morón, C., Jaramillo, K., Mendoza, L. y Román, R. 2009. Evidencia serológica de Ehrlichiosis humana en Ancash, Perú. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. **26(1)**: 54-57.

5. Arraga- Alvarado, C.M. 1992. Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Reporte de 55 casos. Rev. Cient. FCV de LUZ. **2(2)**: 41-52.

6. Arraga-Alvarado, C., Monero-Ojeda, M., Berdoni, A., Anderson, B.E., Parra, O. 1996. Human ehrlichiosis: report of the 1st case in Venezuela. Rev Invest Clin. **37**: 35-49.

7. Arraga-Alvarado, C.M., Parra, O., Palmar, M., Chango, R., Alvarado, M.1997. *Ehrlichia platys*: Preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. Rev Cient. FCV-LUZ. **7(2)**: 99-109.

8. Arraga-Alvarado, C., Palmar, M., Parra, O., Salas, P. 2003. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys)* in dogs from Maracaibo, Venezuela: An ultraestructural study of experimental and natural infections. Vet. Pathol. **40**: 149-156.

9. Assuar, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. [Consulta: 25 de marzo de 2012].

10. Baker, D.C., Simpson, M., Gaunt, S.D., Corstvet, R.E. 1987. Acute *Ehrlichia platys Infection* in the dog. Vet. Pathol. **24**: 449-453.

11. Beall, C.A. y Patel, R. 2005. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. Diagn. Microbiol. Infec. Dis. **53**: 301-306.

12. Beall, M., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P., Mainville, C., Hegarty, B.C., y col. 2008. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. Vector Borne Zoonotic Dis. **8(4)**: 455- 464

13. Bélanger, M., Sorenson, H.L., France, M.K., Bowie, M.V., Barbet, A.F., Breitschwerdt, E.B. y Alleman, A.R. 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. J.Clin. Microbiol. **40 (9)**: 3506-3508

14. Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. y Hancock S. I. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewimgii,* or *Bartonella vinsonii.* J. Clin. Microbiol. **36 (9)**: 2645-2651

15. Bulla, C., Takahira, R.K., Araújo, J.P., Trinca, L.A., Souza, R. y Wiedmeyer, C.E. 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. Vet. Rest. **35**: 141-146

16. Castro, M.B., Machado, R.Z., Tomaz, L.P., Alessi, A.C. y Costa, M.T. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet. Parasitol. **119**: 73-86

17. Cuadra, M.M. Filogenia bacteriana mediante el análisis del RNAr 16S. www.arareko.net/biology/bacterial_phylogeny/index.pdf [Consulta: 16 de Enero de 2012].

18. Chang, W.L., Pan, M.J. 1996. Specific Amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. j. Clin. Microbiol. **34(12)**: 3142- 3146.

19. Chen, S.M., Dumler, J.S., Bakken J.S. y Walker, D.H. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. **32(3)**: 589-595.

20. Da Costa, P.S., Carvalho, L.M., Brigatte, M.E., Bartolomeu, D. 2006. More about human monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. Braz. J. Infect. Dis. **10(1)**: 7-10.

21. Dawson, J.E., Biggie, K.L., Warner, C.K., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J.F. y Olson, J.G. 1996a. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human Ehrlichiosis, in dog from southeast Virginia. A. J. Vet .R. **57(8)**: 1175- 1179.

22. Dawson, J.E., Warner, C.K., Baker, V., Ewing, S.A., Stallknecht, D.E., Davidson, W.R., Kocan, A.A. y col. 1996b. Ehrlichia-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Parasitol. **82(1)**:52- 58.

23. De Paiva, D.P., Schwartz, D.S., De Morais, H.S., Breitschwerdt, E.B. 2007. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. **7(4):** 689-697.

24. Dumler, J.S., Chen, S.M., Asanovich, K., Trigiani, E., Popov, V.L., Walker, D.H. 1995. Isolation and characterization of a new strain of *Ehrlichia chaffensis* from a patient with nearly fatal monocytic Ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **33(7)**: 1704-1711.

25. Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. y colaboradores. 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 "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 2145-2165

26. Eddlestone, S.M., Diniz, P.P., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Cho, D., Hosgood, G., y col. 2007. Doxycycline clearence of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. J. Vet. Intern. Med. **21**: 1237-1242.

27. Felek, S., Unver, A., Stich, R.W. y Rikihisa, Y. 2001. Sensitive detection of *Ehrlichia chaffeensis* in cell culture, blood, and tick specimens by Reverse Transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. **39(2)**: 460-463.

28. Gajadhar, A.A., Lobanov, V., Scandrett, W.B., Campbell, J., Al-Adhami, B. 2010. A novel *Ehrlichia* genotype detected in naturally infected cattle in North America. Vet. Parasitol. **173**: 324-329.

29. Gil, N., Martínez, M. y Triana-Alonso, F. 2008. Identificación microscópica y molecular de Ehrlichias en perros del estado Aragua- Venezuela. Salus online. **12(1)**: 197-204

30. Góngora-Bianchi, R.A., Zavala-Velàzquez, J.,Castro-Sansores, C.J. y González-Martínez, P.1999. First case of human Ehrlichiosis in Mexico. Emer. Infect. Dis. **5**: 481

31. Greene, C.E. 2008. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. Editorial Elsevier. Tercera Edición. St. Louis.

32. Hancock, S.I., Breitschwerdt, E.B. y Pitulle, C. 2001. Differentiation of *Ehrlichia platys* and *E. equi* infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. J. Clin. Microbiol. **39(12)**: 4577-4578.

33. Harris, E. 1998. A Low- Cost Approach to PCR. Appropriate transfer of biomolecular techniques. Editorial Oxford. Oxford, New York, E.U.A.

34. Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., Cornelissen, A.W. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. J.Clin. Microbiol. **37(9)**: 2745-2749

35. Harrus, S., Day, M.J., Waner, T., Bark, H. 2001. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. Vet Microbiol. **83**: 343-349

36. Harrus, S. y Waner, T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. Vet. J. **187**: 292-296

37. Harvey, J.M., Simpson, C.F. y Gaskin, J.M. 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. J. Infect. Dis. **137(2)**:182-188.

38. Hoskins, J. 2000. *Ehrlichia canis* and Ehrlichiosis. IDEXX.

39. Huang, H., Unver, A., Perez, M., Orellana, N.G., Rikihisa, Y. 2005. Prevalence and molecular analisys of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. Braz. J. Microbiol. **36**: 211-216

40. Inokuma, I., Brouqui, P., Drancourt, M., Raoult, D. 2001. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. J. Clin. Microbiol. **39 (9)**: 3031-3039

41. Inokuma, H., Fujii, K., Okuda, M., Onishi, T., Beaufils, J.P., Raoult, D., Brouqui, P. 2002. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon *groESL* and the citrate synthase gene (*gltA*) of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *platys* for phylogenetic and diagnostic studies. Clin. Diagn. Lab. Inmunol. **9(5)**: 1132- 1136.

42. Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **32 (7)**: 1658-1662

43. Jado, I., Escudero, R., Gil, H., Jiménez-Alonzo, M.I., Sousa, R., García-Pérez, A.L., Rodríguez-Vargas, M. 2006. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. J. Clin. Microbiol. **44(12)**: 4572-4576

44. Kakoma, I., Hansen, R.D., Anderson, B.E., Hanley, T.A., Sims, K.G., Liu, L., Bellamy, C, y col.1994. Cultural, molecular, and inmunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **32(1)**: 170- 175.

45. Kawahara, M., Tajima, T., Torji, H., Yabutani, M., Ishii, J., Harasawa, M., Isogai, E., y col. 2009. *Ehrlichia chaffensis,* infection of sika deer, Japan. Emerg. Infect. Dis. **15(12)**: 1991-1993.

46. Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. y Schmidt, T.M. 2001. rrndb: ribosomal RNA operon copy number database. Nucleic Acids Research. **29:** 181-184.

47. Lara, V., Arancibia, D., Saenz, M. y Bonilla, J.L. 2010. Hallazgo de Ehrlichiosis canina causada por *E. canis* en una comunidad del Municio de León, Nicaragua. Rev. Electrón. Vet. **11(3)**: 1-10.

48. Lee, J.H., Park, H.S., Jang, W.J., Koh, S.E., Kim, J.M., Shim, S.K. y Park, M.Y. 2003. Differentiation of Ricckettsiae by *groESL* gene analysis. J. Clin. Microbiol. **41(7)**: 2952-2960.

49. López, J., Rivera, M., Concha, J.C., Gatica, S., Loeffeholz, M. y Barriga, Omar. 2003. Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serológica. Rev. Méd. Chile. **131(1)**: 67-70.

50. Luque. J., Herráez. Á. 2006. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Editorial Harcourt. Madrid-España.

51. Macieira, D., Messick, J., Figueiredo, A., Alexandre I.M., Coelho, G.F., Oliveira, N.K., Pereira, N.R. 2005. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. Vet. Clin. Pathol. **34 (1)**: 44-48.

52. Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R., Ristic, M., Cox, D., McDade, J. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic *Rickettsia*. New. Engl. J. Med. **316 (14)**: 853-855.

53. Martinez, M.C., Gutierrez, C.N., Monger, F., Ruiz, J., Watts, A., Mijares, V.M., Rojas, M.G. y colaboradores. 2008. *Ehrlichia chaffensis* in child, Venezuela. Emerg. Infect. Dis. **14(3)**: 519-520.

54. Massung, R.F. y Slater, K.G. 2003. Comparison of PCR Assays for Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *A. phagocytophilum.* J. Clin. Parasitol. **41(2)**: 717- 722.

55. Mathew, J.S., Ewing, S.A., Malayer, J.R., Fox, J.C. y Kocan, K.M. 2000. Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection. J. Vet. Diagn. Invest. **12**: 456- 459.

56. Mavromatis, K., Doyle, C.K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M.P., Chain, P., Shin, M. y colaboradores. 2006. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. J. Bacteriol. **188(11)**: 4015-4023.

57. Mc.Pherson, M. y Møller, S. 2006. PCR. Editorial Taylor & Francis Group, Second Edition, New York, E.U.A.

58. McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Chinsangaram, J., Aestuchea, G.Y., Osburn, B.I. 1996. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. J.Vet. Diagn. Invest. **8**: 441-447.

59. McBride, J.W., Corstvet, R.E., Breitschwerdt, E.B. y Walker, D.H. 2001. Inmunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. J. Clin. Microbiol. **39(1):** 315- 322.

60. McClure, J.C., Crothers, M.L., Schaefer, J.J., Stanley, P.D., Needham, J.R., Ewing, S.A., Stich, R.W. 2010. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. A.A.C. **54(12)**: 5012-5020.

61. Méndez, C.L. 2005. Evaluación hematológica e inmunofenotípica de la ehrlichiosis canina. Evolución tras la administración de dipropionato de imidocarb. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España.

62. Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., Lappin, M.R. 2002. Consensus statement on Ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. J. Vet. Intern. Med. **16**: 309-315.

63. Nuti, M., Serafini, D.A., Bassetti, D., Ghionni, A., Russino, F., Rombolà, P., Macri, G., y col. 1998. Ehrlichia infection in Italy. Emerg. Infect. Dis. **4(4)**: 663-665.

64. Oteo, J.A. y Brouqui, P. 2005. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **23(6)**: 375- 380.

65. Pan, H., Sun, Y., Ma, Y.H., Tong, S.D., Wen, B.H. 1999. Identification of an etiologic agent of canine ehrlichiosis found in Guangzhou of China. Medical Institute, Yanling Shahe,Guangzhou, Guang Dong 510507, China. (Resultados no publicados)

66. Parola, P., Roux, V., Camicas, J. L., Baradji, I.,Brouqui, P., Raoult, D. 2000. Detection of Ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **94:** 707-708

67. Parola, P., Cornet, J. P., Sanogo, Y.O., Miller, R.S., Thien, H.V., González, J.P., Raoult, D., y col. 2003. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from Thai-Myanmar Border and Vietnam. J. Clin. Microbiol. **41(4)**: 1600-1608.

68. Peleg, O., Baneth, G., Eval, O., Inbar, J. y Harrus, S. 2010. Multiplex Real-Time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. Vet. Parasitol. **173(3-4)**: 292-299.

69. Pérez. M., Rikihisa. Y., Wen. B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent asolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J.Clin. Microbiol. **34 (9)**: 2133-2139.

70. Preziosi, D.E. y Cohn, L.A. 2002. The increasingly complicated story of *Ehrlichia.* Compend. Contin. Educ. **24 (4)**: 277-289

71. Pusterla, N., Berger, J., Deplazes, P., Wolfensberger, C., Muller, W., Horauf, A., Reusch, C., y col.1998. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic ehrlichia infection in dogs in Switerland. J.Clin. Microbiol. **36(12)**: 3460-3462

72. Raoult, D. y Roux, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. **10 (4)**: 694-719.

73. Rikihisa, Y., Ewing, S.A. y Fox, J.C. 1994. Western inmunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis, E. canis* or *E. ewingii* infection in dogs and humans. J. Clin. Microbiol. **32(9)**: 2107- 2112.

74. Ripoll, C.M., Remondegui, C.E., Ordoñez, G., Arazamendi, R., Fusaro, H., Hyman, M., Paddock, C. y col. 1999. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. Am. J. Trop. Med. Hyg. **61(2)**: 350-354.

75. Rodicio M.R. y Mendoza M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microb Clin. **22**:238-45

76. Rojas, R. 2009. Detección de Ehrlichiosis humana, mediante técnica de PCR, en una localidad del Salado Alto, Ejido y la Mucuy Baja del Estado Mérida. Tesis doctoral, Universidad de los Andes, Caracas, Venezuela.

77. Sánchez, I.P., Saldaña, H.A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. CIENCIA UANL. **7(3)**: 323-335.

78. Simpson, C.F. 1974. Relationship of *Ehrlichia canis* infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. Infect. Inmun. **10(3)**: 590-596.

79. Skotarczak, B. 2003. Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med. **10**: 137-141

80. Stich, R.W., Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Needham, G.R., Grover, D.L. y Jittapalapong, S. 2002. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. J. Clin. Microbiol. **40(2)**: 540-546

81. Stone, J.H., Dierberg K., Aram, G.,Dumler, J.S. 2007. Human monocytic ehrlichiosis. J. Amer. Med. Asoc. **292(18)**: 2263- 2270.

82. Strick, N.I., Alleman, A.R., Barbet, A.F., Sorenson, H.L., Wamsley, H.L., Gaschn, E.P., Luckschander, N., y col. 2007. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. Clin. Vacc. Immunol. **14(3)**: 262-268.

83. Suto, Y., Suto, A., Inokuma, H., Obayashi, H., Hayasi, T., 2001. The first confirmed canine case of Ehrlichia canis infection in Japan. Vet. Rec. **148(26)**:809–811.

84. Uilenberg, G., Thiaucourt, F., Jongejan, F., 2004. On molecular taxonomy: what is in a name? Exp. Appl. Acarol. **32(4)**:301–312.

85. Unver, A., Pérez, M., Orellana, N., Huang, H., Rikihisa, Y. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. J. Clin. Microbiol. **39(8)**:2788–2793.

86. Unver, A., Rikihisa, Y., Kawahara, M. y Yamamoto, S., 2003. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. Ann. NYAcad. Sci. **990**:692–698.

87. Venzal, J.M., Estrada, A., Castro, O., Souza, C.G., Portillo, A., Oteo, J.A. 2007. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguíneus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. Parasitol. Latinoam. **62**: 23-26.

88. Walker, D.H. y Dumler, J.S. 1996. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. Emerg. Infect. Dis. **2 (1)**: 18-29.

89. When, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.Y., Zhi, N. y Couto, G.C. 1997. Comparison of nested-PCR with inmunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. J. Clin. Microbiol. **35(7)**: 1852- 1855.

90. Woody, B.J. y Hoskins, J.D., 1991. Ehrlichial diseases of dogs. Vet. Clin. N. Am. **21(1)**:75–98.

91. Yu, X.J., McBride, J.W., Walker, D.H. 2006. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. Vet. Parasitol. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.027.

Consultas en línea:

92. URL:http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/ImageLibrary/S-Z/Ticks/body_Ticks_il4.htm [Consulta: 20 de agosto de 2011]

10. ANEXOS

Anexo 1. Blast de los cebadores diseñados para el nuevo ensayo PCR ARNr 16S.

- Cebador sentido RYaF16S

Description	Query coverage	Max ident
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum isolate YDH6 clone 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys isolate 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis MSIA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale clone 1s from China 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale clone 1 from China 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale isolate ZJ02/2009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum clone h997 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis clone Sicily 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain FC-CG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum isolate 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys strain Hd83 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Hd22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain K2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain K1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale str. Florida, complete genome	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum genotype APV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum genotype APII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum genotype API 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain Ishigaki-2007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia chaffeensis clone 16S_Echaf_Ap 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain NTN-1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain EQ-1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain CcAnk 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%

Anaplasma phagocytophilum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis from Panthera onca 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis from Leopardus pardalis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis from Leopardus tigrinus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Kutahya 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN18 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN17 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain ECAN_Bkk_07 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Brazil-CO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Brazil-CO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain BS16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain Susy 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis str. Jake, complete genome	100%	100%
Anaplasma platys strain Okinawa 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia chaffeensis str. Arkansas, complete genome	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum HZ, complete genome	100%	100%
Anaplasma marginale partial 16S rRNA gene, isolate Lushi	100%	100%
Anaplasma marginale isolate 2:3 from Zimbabwe 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale from Uruguay 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale isolate tailed from Israel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain F12 from Australia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain Veld from South Africa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Homo sapiens chromosome 5 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly	85%	100%
Homo sapiens chromosome 5 genomic contig, alternate assembly HuRef SCAF_1103279188146, whole genome shotgun sequence	85%	100%

- Cebador antisentido RYaR16S

Description	Query coverage	Max ident
Anaplasma phagocytophilum isolate YDH6 clone 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain HB-SZ-HGA-S05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale clone 1s from China 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain China-C-Aa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale str. Florida, complete genome	100%	100%
Ehrlichia canis strain Nero 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys strain Gigio 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Kutahya 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain TWN2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Brazil-CO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis strain Brazil-CO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain ZJ-HGA-16S-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis str. Jake, complete genome	100%	100%
Anaplasma marginale 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia chaffeensis str. Arkansas, complete genome	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum HZ, complete genome	100%	100%
Anaplasma marginale from Macheng buffalo 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale from Hongan buffalo 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale partial 16S rRNA gene, isolate Lushi	100%	100%
Anaplasma marginale isolate 2:3 from Zimbabwe 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale from Uruguay 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale isolate tailed from Israel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%

Anaplasma marginale strain F12 from Australia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain Veld from South Africa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale isolate Eland from South Africa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain South Idaho 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain Florida 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma marginale strain Virginia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	100%
Anaplasma marginale str. St. Maries, complete genome	100%	100%
Ehrlichia equi isolate CASOLJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia sp. 'HGE agent' isolate CAHU-HGE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, partial cds	100%	100%
Ehrlichia phagocytophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia equi 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Ehrlichia phagocytophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	95%
Anaplasma platys strain Okinawa 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	65%	100%
Ehrlichia canis strain Kagoshima 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	65%	100%
Ehrlichia canis isolate VTE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	65%	100%
Homo sapiens chromosome 16 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly	100%	100%
Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly	100%	100%

Anexo 2. Secuencias de *A. platys* disponibles en el GenBank reportadas en Venezuela

2.1. *Anaplasma platys*, secuencia parcial del gen ARNr 16S, cepa Maracay

GenBank: HE856819.1

5`ATAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTG
GGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGG
GTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGATACGGTCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAA
GGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCGGTAA
GTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTCGAGTCCGGGAGAGGATAGCGG
AATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTG
ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGTACTCCAC**3**`

Anexo 3. Secuencias de *E. canis* disponibles en el GenBank reportadas en Venezuela

3.1. Ehrlichia canis aislado VHE del gen ARNr 16S, secuencia parcial

GenBank: AF373612

5`AACGAACGCTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTG
TTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACT
GTATAATCCCCGAGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT
TACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCTGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCACGTAGGTGGACTAGTAAGTTAAAAGT
GAAATACCAAAGCTTAACTTTGGAGCGGCTTTTAATACTGCTAGACTAGAGGTCGAAAGAGGATAGCGGAATTCCTAG
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTTCGATACTGACACTGAGG
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAAATGTGAGGAT
TTTATCTTTGTATTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAAAACCTTACCACTTTTTGACATGA
AGGTCGTATCCCTCCTAACAGGGGGAGTCAGTTCGGCTGGACCTTACACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATTCTTAGTTACCAACAGGTAATGCTGGGCACTCTA
AGGAAACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAATCAGCACGGCCCTTATAGGGTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCAACTACAATAGGTTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCTAATCCATAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATT
GTTCTCTGAAACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCATCACGCCACGGTGAATACGTTCTCGG
GTCTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGCCA
TTTAAG**3**`

3.2. *Ehrlichia canis*, aislado VDE del gen ARNr 16S, secuencia parcial

GenBank: AF373613.1

5`AACGAACGCTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTG
TTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACT
GTATAATCCCCGAGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT
TACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCTGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCACGTAGGTGGACTAGTAAGTTAAAAGT
GAAATACCAAAGCTTAACTTTGGAGCGGCTTTTAATACTGCTAGACTAGAGGTCGAAAGAGGATAGCGGAATTCCTAG
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTTCGATACTGACACTGAGG
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAAATGTGAGGAT
TTTATCTTTGTATTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAAAACCTTACCACTTTTTGACATGA
AGGTCGTATCCCTCCTAACAGGGGGAGTCAGTTCGGCTGGACCTTACACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATTCTTAGTTACCAACAGGTAATGCTGGGCACTCTA
AGGAAACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAATCAGCACGGCCCTTATAGGGTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCAACTACAATAGGTTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCTAATCCATAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATT
GTTCTCTGAAACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCATCACGCCACGGTGAATACGTTCTCGG
GTCTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGCCA
TTTAAG**3`**

Anexo 4. Secuencias parciales del gen ARNr 16S de Rickettsias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* obtenidas de la secuenciación mediante el empleo de los cebadores RYaF16S y RYaR16S en el ensayo PCR ARNr 16S contra Rickettsias.

4.1. Secuencia parcial cepa *E. canis* 1101

5`CGTTGGTGGGTAATACTGTATAATCCCCGAGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACTGAGA
TACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGAAGAAGTCCCGGCA
AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCACGTAGGT
GGACTAGTAAGTTAAAAGTGAAATACCAAAGCTTAACTTTGGAGCGGCTTTTAATACTGCTAGACTAGAGGTCGAAAG
AGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGG
TTCGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGAT
GAGTGCTAAATGTGAGGATTTTATCTTTGTATTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAG
ACTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAAAACC
TTACCACTTTTTGACATGAAGGTCGTATCCCTTCTAACAGGGGGAGTCAGTTCGGCTGGACCTTACACAGGTGCTGCA
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATTCTTAGTTACCAACA
GGTAATGCTGGGCACTCTAAGGAAACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAATCAGCACGGCCC
TTATAGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTACAATAGGTTGCGAGACCGCAAGTTTAGCTAATCCATAAAA
GTTGTCTCAGTTC**3`**

4.2. Secuencia parcial cepa *A. platys* 1112

5`TAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCT
ACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGG
TTGTAAAACTCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCGGTAAGTTAAAGGTG
AAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTCGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGT
GTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTGAATGTGGGGACG
TTTTGTCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCACTTCTTGACATG
GAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCCTCATCCTTAGTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGCACTTT
AAGGAGACTGCCAGTGGTAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAGTCAGCACGGCCCTTATGGGGTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGTGACTACAATAGGTTGCAATGTCGCAAGGCTGAGCTAATCCGTAAAAGTCATCTCAGTTCGGAT
TGTCCTCTGCAACTCGAGGGC**3`**

Anexo 5. Blast de la secuencia de *E. canis* 1101.

Description	Query coverage	Max ident
Ehrlichia canis strain Brazil-CO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone D28A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain Nero 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain Kutahya 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN18 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN17 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain ECAN_Bkk_07 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain TWN1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence >gb|JN622141.1| Ehrlichia canis strain NGR clone 64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb|JN982336.1| Ehrlichia canis strain NGR clone 80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb|JN982339.1| Ehrlichia canis strain NGR clone 94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain Brazil-CO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain GR78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain GR21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%

Ehrlichia ovina 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis isolate VDE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis isolate VHE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis str. Jake, complete genome	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis strain Kagoshima 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. strain Germishuys 16S ribosomal RNA gene	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone D12E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 4-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 1-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Ehrlichia sp. EHt224 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. EBm52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 1-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Ehrlichia sp. Fujian 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. EH727 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. Yonaguni138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone HLAE178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 2-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone 2-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
Ehrlichia sp. Yonaguni206 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone HLAE331 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone HLAE346 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. NS101 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. Tibet 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	99%
Ehrlichia ewingii strain 95E9-TS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone HLAE334 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. ERm58 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. EHf669 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone Am-Hc79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia sp. EH1087 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis str. Arkansas, complete genome	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, partial cds	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, partial cds	99%	99%

Ehrlichia chaffeensis strain Arkansas 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb|M73222.1|EHRRRNAF Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia ewingii 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb|M73227.1|EHRRRNAK Ehrlichia ewingii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Uncultured Ehrlichia sp. clone Kh-Hj27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Ehrlichia chaffeensis strain Arkansas 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; and succinate dehydrogenase subunit C (sdhC) gene, complete cds	99%	99%
Ehrlichia sp. Yunnan 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. FN147 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. Shizuoka-36 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. HI-2000 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Candidatus Ehrlichia shimanensis gene for 16S rRNA	99%	98%
Ehrlichia sp. Anan gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. HF565 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. SS15-E-L gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia muris isolate Nov-Ip205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia muris isolate Kh-1550 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. HF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia muris gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia muris strain AS145 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb|U15527.1|EMU15527 Ehrlichia muris 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. 396 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. 360 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia muris gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia sp. P-Mtn 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia muris gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia ruminantium 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	98%
C.ruminantium 16S ribosomal RNA	99%	98%
Ehrlichia ruminantium str. Gardel, complete genome	99%	98%
Ehrlichia ruminantium strain Welgevonden, complete genome	99%	98%
Cowdria ruminantium Bela Vista 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Cowdria ruminantium gene for 16S ribosomal RNA	99%	98%
Uncultured Ehrlichia sp. clone Khabarovsk 362 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Uncultured Ehrlichia sp. clone Khabarovsk 1931 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia ruminantium strain Umbanein 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Cowdria sp. 'South African canine' 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Cowdria ruminantium 16S rRNA gene	99%	98%
Cowdria ruminantium Porto Henrique 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%

Cowdria ruminantium 16S rRNA gene	99%	98%
Ehrlichia ruminantium str. Welgevonden, complete genome	99%	98%
Cowdria ruminantium 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	98%
Ehrlichia ruminantium strain Kiswani 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
Ehrlichia canis strain Gdt3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	99%
Ehrlichia canis strain Gxht67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	99%
Candidatus Neoehrlichia lotoris strain RAC413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%

Anexo 6. Blast de la secuencia de *A. platys* 1112.

Description	Query coverage	Max ident
Anaplasma platys isolate A.pl.#87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys strain Gigio 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys isolate Okinawa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%
Anaplasma platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma platys strain Okinawa 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone G2.12.7B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. Bom Pastor 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone J3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone G2.12.31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. strain Omatjenne 16S ribosomal RNA gene	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone E10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone D5E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone G2.12.35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia platys 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain ApMuc02c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate NE-16S-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate NE-16S-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate Nov-Ip355 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone H151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum 16S ribosomal RNA gene, complete sequence; succinate dehydrogenase subunit C (sdhC) and succinate dehydrogenase subunit D (sdhD) genes,	100%	99%

complete cds; and hypothetical protein 1 gene, partial cds		
Anaplasma phagocytophilum strain Strong 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Susy 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum HZ, complete genome	100%	99%
Ehrlichia equi isolate CAMAWI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia equi isolate CASITL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia equi isolate CAMEBS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 16S rRNA gene, partial, Swedish Tick Ehrlichia type IIb	100%	99%
Ehrlichia sp. 16S rRNA gene, partial, Swedish Tick Ehrlichia type Ib	100%	99%
Ehrlichia sp. 'HGE agent' isolate CAHU-HGE2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 'HGE agent' isolate CAHU-HGE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 16S rRNA (rrn) gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb|U02521.1|U02521 Ehrlichia sp. 'HGE agent' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain ApMuc01c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ06/2009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate Sv-shrew70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate Sv-vole8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain HB-SZ-HGA-S05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain HB-SZ-HGA-S03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate Irk-Ip662 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate Irk-Ip625 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate Sv-Ip854 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain China-C-Tt 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain China-C-Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain China-C-Aa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Jilin-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 'LGE agent' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia equi isolate CASOLJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia-like sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia phagocytophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%

Ehrlichia equi 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia phagocytophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain HB-SZ-HGA-S04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain ZJ-HGA-16S-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain ZJ-HGA 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain ZJ-HGA-16S-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. RND-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
Anaplasma phagocytophilum isolate ZJ01/2008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Anaplasma phagocytophilum clone J4-3-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
Ehrlichia sp. 'HGE agent' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Ehrlichia sp. 'HGE agent' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Uncultured Anaplasma sp. clone GS29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Anaplasma sp. 'South Africa dog-1245' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Anaplasma sp. 'South Africa dog-1076' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Anaplasma sp. 'South Africa dog-1108' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Uncultured Anaplasma sp. clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Anaplasma sp. Ac30B gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	98%
Anaplasma sp. Ac52D gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	98%
Anaplasma sp. NS108 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	98%
Anaplasma phagocytophilum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SS33P-L	100%	98%
Anaplasma phagocytophilum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:ES34	100%	98%
Anaplasma phagocytophilum isolate YDH6 clone 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Uncultured Anaplasma sp. clone 201-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Uncultured Anaplasma sp. clone 202-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Uncultured Anaplasma sp. clone 201-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
Anaplasma phagocytophilum strain Rus30-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain BelBmi37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Rus29-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Est1090 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb|HQ629924.1| Anaplasma phagocytophilum strain Est2535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb|HQ629925.1| Anaplasma phagocytophilum strain Est2540 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	99%

Anaplasma phagocytophilum strain Est2477 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	99%
Anaplasma phagocytophilum strain Rus30-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	99%