

Santamaría A.^{1,2}, Gottdenker N.³, Yabsley M.³ y Calzada J.E.^{1,2}
 Instituto Conmemorativo Gorgas (ICGES) ¹, Universidad Nacional de Panamá (UNP) ²
 Y Universidad de Georgia (UGA) ³

INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por parásitos intracelulares del género *Ehrlichia*, pertenecientes a la Familia *Rickettsiae*. Actualmente, tiene una distribución mundial y entre las especies de Ehrlichia que causan esta enfermedad podemos mencionar: *Ehrlichia canis* y *E. chaffensis* (Ehrlichiosis monocítica), *E. ewingii* (Ehrlichiosis granulocítica) y *Anaplasma platys* (en plaquetas).

La Ehrlichiosis canina, es un trastorno multi-sistémico, que presenta tres etapas. La primera es una fase aguda (fiebre, exudado oculonasal, anorexia, depresión, epistaxis (sangramiento nasal, pérdida de peso, linfadenomegalia), luego una etapa Sub-clínica donde el animal recupera el peso perdido y desaparece el estado febril por lo general las dos primeras etapas suelen ser asintomáticas. Sin embargo, la fase crónica se caracteriza por pérdida progresiva de peso, anorexia, anemia y signos hemorrágicos severos en piel, mucosas y diversos órganos.

El objetivo fundamental de nuestro estudio fue determinar la prevalencia de la Ehrlichiosis canina en la ciudad de Panamá y las especies de Ehrlichias causantes de la enfermedad.

E. canis
E. ewingii
E. chaffensis
A. platys

Para determinar las especies de *Ehrlichia* se utilizó un "nested PCR", reamplificando el producto de PCR primario con primers especie-específicos para *E. canis*, *E. Chaffensis* y *E. ewingii* (Yabsley et al., 2003; Labruna et al., 2004). Pero, para confirmar la presencia de *A. platys* se utilizó el protocolo de Matoi et al., 2001, con el cual se amplifica un producto de 678 bp en el PCR nested. Posteriormente, las muestras positivas por la PCR fueron secuenciadas con los primers del nested PCR correspondiente a cada especie para validar los resultados de las pruebas moleculares.

RESULTADOS OBTENIDOS

Microscopía

De acuerdo a los parámetros hematológicos estudiados en 127 muestras, fueron reportadas 64 muestras que presentaban plaquetas bajas (\leq de 120,000 K/ μ l), 5 muestras con glóbulos blancos por debajo de 5×10^3 /mm³. También se reportaron 69 caninos anémicos con la hemoglobina por debajo de 12 g/dl y en 5 muestras los glóbulos blancos se encontraban por debajo de 5×10^3 /mm³. De los 127 frotis sanguíneos analizados, logramos encontrar 3 con mórulas de *Ehrlichia canis* y 12 positivos por inclusiones en plaquetas por *A. platys*. También se reportaron 39 muestras con plaquetas gigantes.

Serología

Serología por <i>E. canis</i>	
Seropositivos	28 muestras
Seronegativos	56 muestras
Indeterminados	6 muestras
TOTAL	90 muestras

Al comparar los resultados de la prueba de ELISA con la técnica de la PCR, las 28 muestras seropositivas por ELISA fueron reportadas como positivas por la PCR. De las 56 muestras negativas por serología se reportaron 49 muestras positivas por PCR. Pero de las 6 muestras indeterminadas por serología, 4 muestras fueron positivas por *E. canis* y 1 muestra positiva por *A. platys* y 1 muestra como infección mixta de ambas especies por la PCR.

Biología molecular

Nested PCR de *A. platys*
 Carriles 1 y 2: muestras positivas a *A. platys*, carril 3 y 4: muestras negativas. Carriles 5 y 6: controles negativos de extracción y PCR respectivamente. Carril 7: control positivo de *A. platys*. Carril 8: marcador molecular.

Secuencia obtenida de *Anaplasma platys*

```
TGT AGGCGGT TCGGTAAGTT
AAAGGTGAAA TGCCAGGGCT
TAACCCTGGA GCTGCTTTTA
ATACTGCCAG ACTCGAGTCC
GGAGAGGAT AGCGGAATTC
CTAGTGATA GGTGAAATTC
```

PCR para *E. canis*

Carril 1: marcador molecular. Carril 2: control negativo de Extracción. Carril 3: muestra positiva a *E. canis*. Carril 4: control positivo a *E. canis* y carril 5 control negativo de PCR.

Secuencia obtenida de *E. canis*

```
GTGCCTGTAGCTCAGCCTGGATAG
AGCATCAGCCTTCTAAGCTGTTGG
TCAGGGGTTTCAATCCCTTCGG
GCACGCCA
```

De acuerdo al análisis molecular de realizado a 196 muestras se obtuvieron 110 muestras positivas a *E. canis*, 10 muestras positivas a *A. Platys*, 16 muestras con infecciones mixtas de ambas especies y 70 muestras negativas por PCR. Los resultados obtenidos por la técnica de PCR fueron validados a través de la técnica de secuenciación del ADN de las muestras.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis moleculares la *E. canis* representa la especie más prevalente, representada por el 56.1% (Ehrlichiosis monocítica) de las muestras evaluadas. El 5.1% de las muestras fueron positivas por *A. platys* (plaquetas) y el 8.2% resultaron ser infecciones mixtas de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. No se registraron muestras positivas a *E. chaffensis* ni a *E. ewingii*, a pesar de ser especies reportadas en estudios en caninos de países vecinos y en investigaciones con garrapatas de diferentes zonas de nuestro país. Las técnicas de biología molecular nos apoyan en la confirmación del diagnóstico y a determinar la especie implicada en la infección, sirviendo de herramienta para conocer la situación epidemiológica de la enfermedad y orientar las medidas de control.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Para este estudio se evaluaron 201 de sangre entera, provenientes de caninos con sintomatología compatible a Ehrlichiosis (trombocitopenia, leucopenia y anemia). Las muestras fueron colectadas en los distritos de: Panamá, San Miguelito y Chorrera, en el período comprendido desde el 2008 hasta el año 2010.

Para determinar la presencia de las especies de Ehrlichias en cada muestra, se evaluaron tres metodologías. Para medir los parámetros hematológicos se hicieron hemogramas completos y frotis sanguíneos teñidos con giemsa, utilizando la microscopía como técnica de diagnóstico. Para detectar la presencia de anticuerpos anti- *E. canis* se utilizaron muestras de suero o plasma utilizando el método de ELISA (INGEZIM EHRLICHIA 15.EHR.K1), como prueba serológica. Para realizar las pruebas moleculares se utilizó la técnica de la nested PCR y el método de secuenciación de ADN, los cuales fueron basados en la amplificación del gen 16S rRNA.

AGRADECIMIENTOS

Extendemos nuestro agradecimiento al excelente apoyo de investigación proporcionado por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), al Sistema Nacional de Investigación (SNI) y a los colaboradores de la Universidad de Georgia (UGA).