

Detección canina de *anaplasma platys* mediante PCR en tiempo real

María José Tintel A

tintelvet@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-8333-2769>

Centro de Especialidades Veterinarias CEV. Asunción- Paraguay.

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica.

CEDIC. Asunción- Paraguay.

Paola Arze Selich

pao.aussie@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1103-8552>

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica.

CEDIC. Asunción- Paraguay.

Miriam Soledad Rolón

rolonmiriam@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8123-4260>

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica.

CEDIC. Asunción- Paraguay.

Celeste Vega Gómez

mcvegagomez@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-3533-3211>

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica.

CEDIC. Asunción- Paraguay.

RESUMEN

Anaplasma platys es una bacteria pleomórfica intracelular, gramnegativa obligada que afecta especialmente a las plaquetas del perro, transmitida principalmente por garrapatas. Patógeno de importancia relevante en medicina veterinaria y reconocido mundialmente por su potencial zoonótico. El objetivo del trabajo fue determinar por PCR a tiempo real la presencia de *A. platys* en un canino de Asunción. Destacamos que es la primera evidencia molecular de *A. platys* en el país utilizando el método de qPCR, cuya secuenciación del producto obtenido confirmó la infección por **CP046391.1** *Anaplasma Platys* con homología 100%. El desarrollo del método qPCR contribuye al avance de la investigación con *A. platys*, constituyendo una herramienta más sensible y específica para situaciones que indiquen una posible enfermedad clínica, pero con métodos diagnósticos tradicionales como citología sanguínea o serología negativa.

Palabras clave: anaplasma; *platys*; garrapata; canino; qPCR.

Correspondencia: ciro. tintelvet@gmail.com

Artículo recibido 25 diciembre 2022 Aceptado para publicación: 25 enero 2023

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

Todo el contenido de **Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar**, publicados en este sitio están disponibles bajo

Licencia [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) 

Cómo citar: Tintel A, M. J., Arze Selich, P., Rolón, M. S., & Vega Gómez, C. (2023). Detección canina de anaplasma platys mediante PCR en tiempo real. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 1674-1680. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4513

Canine detection of anaplasma *platys* by real-time PCR

ABSTRACT

Anaplasma platys is an obligate gram-negative, intracellular pleomorphic bacterium that especially affects dog platelets, transmitted mainly by ticks. Pathogen of relevant importance in veterinary medicine and recognized worldwide for its zoonotic potential. The objective of the work was to determine by real-time PCR the presence of A. platys in a canine from Asunción. We highlight that it is the first molecular evidence of A. platys in the country using the qPCR method, whose sequencing of the obtained product confirmed the infection by CP046391.1 Anaplasma Platys with 100% homology. The development of the qPCR method contributes to the advancement of research with A. platys, constituting a more sensitive and specific tool for situations that indicate a possible clinical disease, but with traditional diagnostic methods such as blood cytology or negative serology.

Keywords: *anaplasma; platys; ticks; dog; qPCR.*

INTRODUCCIÓN

Anaplasma platys es una bacteria pleomórfica intracelular, gramnegativa obligada que afecta a las plaquetas del perro, causando trombocitopenia cíclica infecciosa canina. Esta bacteria fue alojada anteriormente en el género *Ehrlichia*, pero recientemente ha sido reclasificada en base a un análisis filogenético del gen del ADN ribosómico 16S (*ADNr*) (Dumler *et al.*, 2001). Aunque este agente es importante para la clínica de animales pequeños, *A. platys* tiene una amplia gama de huéspedes, incluidos los felinos (Correa *et al.*, 2011), bovinos (Dahmani *et al.*, 2015), camellos (Li *et al.*, 2015) y humanos (Arraga *et al.*, 2014; Breitschwerdt *et al.*, 2014; Maggi *et al.*, 2013).

Se presume que la garrapata *R. sanguineus* es el vector principal de *A. platys* (Inokuma *et al.*, 2000, Sanogo *et al.*, 2003). Se determinó presencia del patógeno en adultos y ninfas de *R. sanguineus* recolectadas de perros negativos, lo que sugiere que puede estar ocurriendo una transmisión transstadial (Ramos *et al.*, 2014). Recientemente, un estudio sugiere que *A. platys* puede transmitirse verticalmente de la perra preñada a la descendencia (Latrofa *et al.*, 2016).

El patógeno se encuentra en perros con trombocitopenia leve y grave, pero también en los asintomáticos. Además, la coinfección con otros patógenos transmitidos por vectores influyen en la gravedad de la infección por *A. platys* (de Caprariis *et al.*, 2011, Eiras *et al.*, 2013). Existe evidencia de la presencia de *A. platys* en perros de todo el mundo. En América del Sur, se han reportado perros infectados en Argentina, Brasil, Chile, Venezuela y Paraguay (Abarca *et al.*, 2007, Cicuttin *et al.*, 2014, Eiras *et al.*, 2013, Lasta *et al.*, 2013, Santos *et al.*, 2009, Suksawat *et al.*, 2001; Tintel *et al.*, 2016).

En Paraguay hay pocos estudios publicados sobre patógenos transmitidos por garrapatas que afectan a los perros. El objetivo del presente trabajo fue determinar por PCR a tiempo real la presencia de *A. platys* en un canino de Asunción. Destacamos que es la primera evidencia molecular de *A. platys* en el país utilizando el método de qPCR.

METODOLOGÍA

Anamnesis

Canina hembra de raza pitbull de 10 años con sintomatología clínica inespecífica; manifestando hipertermia (40.2° C), apatía, inapetencia, membranas mucosas pálidas, fatiga, movimientos incoordinados, poliartritis, miositis y enteritis hemorrágica. El animal fue examinado y se recogieron muestras para citología sanguínea y moleculares.

Microscopía Óptica

Se preparó frotis de sangre periférica, las láminas se fijaron en metanol, se tiñeron con Giemsa y se sometieron a microscopía de inmersión (100X) para permitir la visualización de mórulas en plaquetas. Se evaluaron 100 campos por lámina.

Análisis Molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de muestra de sangre central con EDTA utilizando kit comercial Gene JET Genomic DNA Purification Kit® (#K0722; ThermoScientific, Waltham, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra de ADN aislada se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

La muestra se examinó mediante la amplificación por PCR a tiempo real (qPCR) de ADN de un fragmento conservado del gen 16S rRNA (345 pb) de bacterias de la familia Anaplasmataceae.

Mediante un conjunto de cebadores específicos Primer Forward (5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3') Primer Reverse (5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'). (Parola et al., 2000).

La PCR se realizó en un volumen final de 20 µL, utilizando 10 µL del HRM PCR MasterMix® (QIAGEN, Germantown, MD), con una concentración final de ADN entre 30 ng/µL y 50 ng/µL, y ambos cebadores con una concentración final de 0,5 µM.

La PCR se ejecutó en el termociclador Rotor-Gene 6000® (QIAGEN), y las condiciones del ciclo fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 10 segundos.

Identificación de Especie de la Familia Anaplasmataceae

Para determinar la especie, se realizó el análisis HRM de la disociación del amplicón inmediatamente después de la conclusión de la PCR en tiempo real. El rango de fusión se estableció entre 80°C y 90°C, con una pendiente de 0,1° C/seg. El análisis de la curva HRM se realizó con el software Rotor Gene 6000 versión 2.1.0 (QIAGEN).

El fragmento obtenido fue secuenciado por la empresa Macrogen (Geumcheon-gu, Seúl, Corea). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron verificadas y purificadas utilizando el software Bioedit versión 7.0. Las secuencias de nucleótidos se compararon con las disponibles en la base de datos pública utilizando el algoritmo Blastn del NCBI BLAST.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas aplicando el algoritmo ClustalW, comparándolas con las secuencias de los genes depositados en el NCBI GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El examen microscópico del frotis de sangre periférica reveló presencia de inclusiones basófilas intraplaquetarias compatibles con mórulas de *A. platys*. (**Fig. 1**)

Teniendo en cuenta la sintomatología inespecífica, más el hallazgo microscópico se inició la terapia antibiótica con doxiciclina 5mg/kg cada 12h por 28 días, con remisión total de síntomas a las 48h.

Consecuentemente, la prueba de qPCR reveló ADN de la familia *Anaplasmataceae* en la sangre del canino (**Fig. 2**). El análisis de la secuenciación del producto por qPCR identificó 100 % homología con la especie *A. Platys* (acceso **CP046391.1**) mediante comparaciones de secuencias realizadas utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) contra la base de datos GenBank.

A. platys va marcando protagonismo en lo que refiere medicina veterinaria a nivel mundial (Rodríguez *et al.* 2016), esto se debe principalmente a su vector *Rhipicephalus sanguineus*, siendo la especie de garrapata más reportada y con mayor distribución geográfica (Sosa *et al.*, 2016; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Estos patógenos van en aumento debido a la actividad del ser humano que ha generado cambios radicales en el medio ambiente, favoreciendo las enfermedades transmitidas por vectores (Suthers, 2004), siendo necesaria la estandarización de técnicas precisas, rápidas y eficaces para la detección de estos microorganismos zoonóticos en las regiones Tropicales y Subtropicales.

Figura 1: Inclusión basófila intraplaquetaria de *A. platys*. Tinción Giemsa. 100X

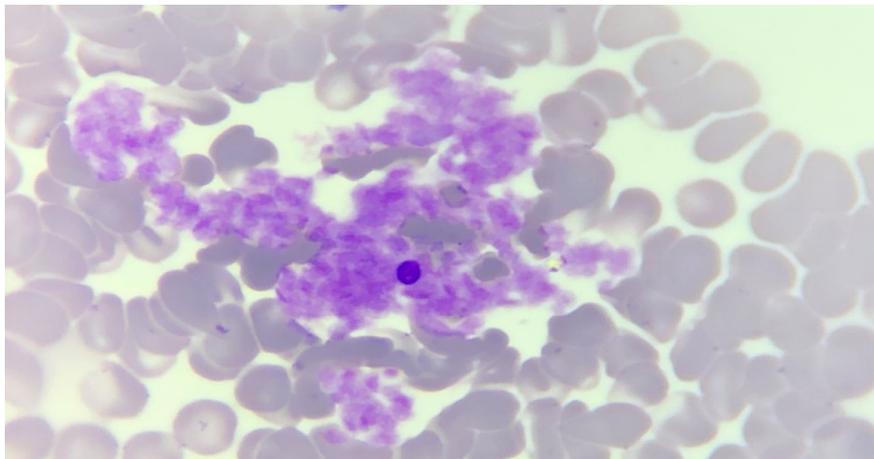
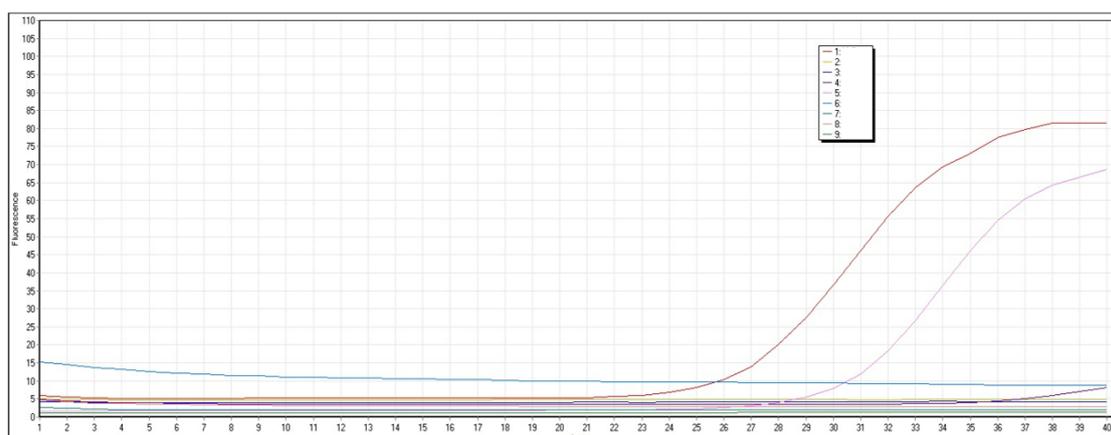


Figura 2: Amplificación por qPCR del gen 16s de la familia Anaplasmataceae.

Muestra 1 corresponde al control positivo. Muestra 5 ADN canino con *A. platys*. Muestra 8 NTC, y las demás muestras incluidas corresponden con caninos negativos.

CONCLUSIONES

Este artículo presenta el primer caso de anaplasmosis *platys* canina mediante el método qPCR. Se confirmó mediante resultados de secuenciación del fragmento del gen 16 S rRNA bacteriano detectado en la sangre del paciente, correlacionándose con la inclusión intraplaquetaria y la respuesta favorable al tratamiento. Este estudio proporciona evidencia molecular adicional que respalda la infección.

FINANCIACIÓN

Financiado con fondos de Becas de Investigación BINV01- 128 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONACYT y el Proyecto FOCEM/MERCOSUR COF N ° 03/11 "Investigación, Educación y Biotecnologías Aplicadas a la Salud"

LISTA DE REFERENCIAS

- Arraga-Alvarado CM, et al. 2014. Case report: molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*;91:1161–1165.
- Breitschwerdt EB, et al. 2014. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit Vectors*;7:298.
- Cabezas-Cruz A, Allain E, Ahmad AS, Saeed MA, Rashid I, Ashraf K, Estrada-Peña A. 2019. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (s). *Parasites & Vectors*. 12:12.

- Correa ES, et al. InvestigaçãO molecular de Ehrlichia spp., e Anaplasma platys em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas [Investigación molecular de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma platys* en gatos domésticos: alteraciones clínicas, hematológicas y bioquímicas. 2011. *Pesq Vet Bras*;31:899–909.
- Dahmani M, et al. 2015. Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis*;39:39–45.
- Dumler JS, et al. 2001. Reorganización de géneros en las familias Rickettsiaceae y Anaplasmataceae en el orden Rickettsiales: unificación de algunas especies de Ehrlichia con *Anaplasma*, *Cowdria* con Ehrlichia y Ehrlichia con *Neorickettsia*, descripciones de seis nuevas combinaciones de especies y designación de Ehrlichia equi y "agente HGE" como sinónimos subjetivos de *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*;51:2145–2165
- Li Y, et al. 2015. *Anaplasma* infection of Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) and ticks in Xinjiang, China. *Parasit Vectors*;8:313
- Maggi RG, et al. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. 2013. *Parasit Vectors*;6:103.
- Parola, P., V. Roux, J.-L. Camicas, I. Baradji, P. Brouqui, and D. Raoult. 2000. Detection of ehrlichiae in African ticks by PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, in press.
- Rodríguez RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad I, Reyes E, Esteve MD, Pérez AA. 2016. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 215:106-113.
- Sosa CG, Quintero T, Vargas M, Gordillo P. 2016. Primer análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros y garrapatas de México. Estudio preliminar. *Revista MVZ Córdoba*. 21(3):5569-5576.
- Sutherst RW. 2004. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*. 17(1):136-73.
- Tintel, M; Amarilla, S. & Nara, E.M. 2016. Ehrlichiosis, enfermedad transmitida por garrapatas y potencial zoonosis en Paraguay. REDVET - Revista electrónica de Veterinaria. 17 (9): 1-9.