



NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

---

Estandarización de una PCR anidada para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp. y  
*Ehrlichia canis* en muestras clínicas de perros.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

**SALVADOR EDUARDO ACEVEDO MONROY**

Asesores:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ  
M. en C. ISIDRO CASTRO MENDOZA  
MVZ. MARÍA ANTONIETA MOJICA SÁNCHEZ

Asesor Técnico:

JULIO MANUEL MÉNDEZ ALEMÁN



Ciudad Universitaria, Cd. M.x., 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"PUEDO EQUIVOCARME  
TENGO TODO POR DELANTE  
NUNCA ME SENTÍ TAN BIEN...  
ME-DIRÁN EL AZAR CON EL VIENTO  
FUERZA NATURAL  
VOY PISANDO FÓSILES, NO ME  
DEJARÁN CAER  
UN MUNDO MICROSCÓPICO ME  
SOSTIENE DE LOS PIES"  
FUERZA NATURAL-G. CERATI.

WER NICHT KÄMPFEN WILL IN DIESER  
WELT, IN DER PERMANENTER KAMPF  
DAS GESETZ DES LEBENS IST, HAT NICHT  
DAS RECHT ZU EXISTIEREN. MEIN KAMPF-  
ADOLF HITLER

ICH KANN NUR FÜR ETWAS  
KÄMPFEN, DAS ICH LIEBE, ICH  
LIEBE NUR, WAS ICH  
RESPEKTIERE, UND RESPEKTIERE  
NUR DAS, WAS ICH KENNE.  
MEIN KAMPF-ADOLF HITLER

#### INVINCIBLE

FOLLOW THROUGH  
MAKE YOUR DREAMS COME TRUE  
DON'T GIVE UP THE FIGHT  
YOU WILL BE ALRIGHT  
'CAUSE THERE'S NO ONE LIKE YOU IN THE  
UNIVERSE

DON'T BE AFRAID  
WHAT YOUR MIND CONCEIVES  
YOU SHOULD MAKE A STAND  
STAND UP FOR WHAT YOU BELIEVE  
AND TONIGHT  
WE CAN TRULY SAY  
TOGETHER WE'RE INVINCIBLE

DURING THE STRUGGLE  
THEY WILL PULL US DOWN  
BUT PLEASE, PLEASE  
LET'S USE THIS CHANCE  
TO TURN THINGS AROUND  
AND TONIGHT  
WE CAN TRULY SAY  
TOGETHER WE'RE INVINCIBLE

DO IT ON YOUR OWN  
IT MAKES NO DIFFERENCE TO ME  
WHAT YOU LEAVE BEHIND  
WHAT YOU CHOOSE TO BE  
AND WHATEVER THEY SAY  
YOUR SOUL'S UNBREAKABLE

MATTHEW JAMES BELLAMY

#### BUTTERFLIES AND HURRICANES

CHANGE EVERYTHING YOU ARE  
AND EVERYTHING YOU WERE  
YOUR NUMBER HAS BEEN CALLED  
FIGHTS AND BATTLES HAVE BEGUN  
REVENGE WILL SURELY COME  
YOUR HARD TIMES ARE AHEAD

BEST,  
YOU'VE GOT TO BE THE BEST  
YOU'VE GOT TO CHANGE THE WORLD  
AND USE THIS CHANCE TO BE HEARD  
YOUR TIME IS NOW

DON'T LET YOURSELF DOWN  
DON'T LET YOURSELF GO  
YOUR LAST CHANCE HAS ARRIVED

MATTHEW JAMES BELLAMY

"TARDA EN LLEGAR

Y AL FINAL, AL FINAL

HAY RECOMPENSA

EN LA ZONA DE PROMESAS"  
ZONA DE PROMESAS-G. CERATI.

"MESES NAVEGANDO

TIERRA A LA VISTA

TODO VOLVERÁ A SER COMO FUE

LAS LUCES DE LA COSTA

SON FAROS DEL PASADO

TODO VOLVERÁ A SER COMO FUE

Y CUANDO SALTO DE CUBIERTA

Y ME ABANDONO A LA CORRIENTE"

HOMBRE AL AGUA-G. CERATI.

NO SOLO NO HUBIERA SIDO NADA SIN USTEDES, SINO CON TODA  
LA GENTE QUE ESTUVO ALREDEDOR DESDE EL COMIENZO; ALGUNOS  
SIGUEN HASTA HOY.

¡¡¡¡GRACIAS TOTALES!!!!

G. CERATI.

## DEDICATORIAS

A Dios nuestro señor *Yahvé*, por permitir mi existencia y enfrentarme a este reto en el destino.

A ILEANA ARACELI ACEVEDO CANTILLO (Koala) el motor y el principal impulso para salir adelante en mi vida y lograr todo esto, gracias por llegar a mi vida, esto es para ti hija mía TE AMO.

A LEILANI ARIEL ACEVEDO CANTILLO (Bebé malvada) un motor más para salir adelante bienvenida al mundo y también esto es para ti hija mía TE AMO.

A MITZY ARACELI CANTILLO SÁNCHEZ (Koala gigante) con quien he compartido esta importante etapa de mi vida. Gracias por tu amor, compañía y apoyo, en las buenas y en las malas. TE AMO.

A mi madre Bertha por estar conmigo siempre. Por su comprensión y amor incondicional, pudo cargar con tres hijos sola, y hemos tratado de darle sostén a su orgullo.

A mi padre Jorge por procurar lo mejor para mí y la familia, estés en donde estés gracias por tus enseñanzas.

A mi hermana Dulce de quien he aprendido a siempre buscar ser el mejor, y quien nunca ha roto esa promesa que le hizo a nuestro difunto padre, gracias por cuidarnos y procurarnos. Gracias por el apoyo otorgado de manera incondicional y con mucho amor.

A mi hermano Jorge con quien compartí y aprendí de la vida. También me ha enseñado a ser perseverante.

A la Familia Cantillo Sánchez quienes me recibieron como un integrante más y nos han apoyado en todo momento.

Han sido parte importante de este logro, gracias por ser parte de mi vida.

Tatanka tu muerte fue dolorosa pero, no en vano pues abriste camino a que tu querido dueño se inspirara para establecer esta prueba de diagnóstico...

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, la FMVZ, el Departamento de Microbiología e Inmunología y al Laboratorio de Microbiología Molecular, quienes me formaron en el ámbito profesional y personal, que me dieron la oportunidad de iniciar y culminar este proyecto.

A la Dra. María Antonieta Mojica Sánchez (Mamá Maritoña) quien como una verdadera madre me dio sus conocimientos con amor y cariño, así como la confianza en mí mismo, y todos aquellos regaños que han ayudado a mi formación.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez que me abrió las puertas de su laboratorio y depositó su confianza en mí, no solo para este proyecto sino para otros más que me sirvieron para fortalecer mi formación académica y personal.

Al Dr. Isidro Castro Mendoza que sin conocerme se dispuso a apoyarme a realizar este trabajo y a la concepción del mismo, gracias por el apoyo y gracias a él conocí muchas personas que me tendieron la mano para realizar este trabajo. También por todos los consejos de vida que me ha dado.

A Julio Manuel Méndez Alemán (El Maestro) quien de alguna manera pensó que podría llegar a hacer algo grande, gracias por tu amistad y la asesoría prestada y no solo dentro del laboratorio.

A Cloé Q. gracias por toda la ayuda prestada y la amistad, gracias a ti conocí personas que me ayudaron de una manera enorme con el material de trabajo.

A Rodrigo Cruz te debo más que las gracias y miles de favores, aliviaste mucho del trabajo que tenía a pesar de tus ocupaciones.

A Liliana Ordoñez López (Pront) Gracias a ti que me ayudaste a adquirir un control positivo para mi trabajo.

Al Dr. Ricardo Oropeza, gracias por tomarse el tiempo para leer y resolver mis dudas. Fueron un gran aporte para este trabajo.

Al Dr. Raymundo Iturbe quien me ha aconsejado tanto y me ha instruido con algo de su vasto conocimiento no solo laboral también de vida, gracias por las aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Joaquín Aguilar, al Dr. Alejandro de la Peña, al Dr. Fausto Reyes y al Dr. Alfredo Castañeda: parte de mi jurado. Por su tiempo, conocimiento y dedicación para las correcciones de este trabajo.

A mis amigos: Cloé, Julio, Liliana, Nathlleli, Rodrigo, Isaac Del Real (Gato), y Roberto (BetoChaz) que además de escucharme y opinar sobre mí trabajo me

ayudaron durante la fase experimental de distintas maneras. Cada uno a su manera me regaló su amistad, la cual aprecio mucho.

A los integrantes Departamento de Microbiología e Inmunología, el Dr. Daniel Atilano, Dra. Laura Noé, Dra. Cristina Rodríguez, Dra. Magda Cristina Rico, Uriel González, Alfredo Cortés, Martín Maqueda, Sra. Francis y todos los que me ayudaron de alguna u otra manera.

A mis amigos de la carrera, Aramis Castro, Ernesto Román, Giovanni González, que siempre estuvieron conmigo a pesar todo, siempre estuvieron ahí:

A mis amigos y compañeros de vida Daniel Reyes, Mauro Fonseca, Abraham Ramírez gracias por hacerme olvidar del estrés cuando el trabajo me absorbía.

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

Al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño de la Universidad Autónoma de Nuevo León quien nos proporcionó el control positivo para llevar a cabo los experimentos.

Al DVM, Ph. D. Shimon Harrus, de The Hebrew University of Jerusalem, gracias por la asesoría y el material genético proporcionado.

A la Dra. Consuelo Almazán de la Universidad Autónoma de Querétaro, gracias por los consejos y comentarios realizados a este trabajo.

A las doctoras y doctores:

Dr. Osvaldo Popocatl Matus del estado de Veracruz.

Dra. Érica Chávez Peón Berle y todo su equipo del estado de Colima.

Dra. Magda Cristina Rico Tavera de la Ciudad de México.

Dr. Ernesto Ávila Escalera Purina y a todo su equipo en la Clínica del Bosque, del Estado de México.

Ya que sin ellos no hubiera existido material de trabajo (muestras) para llevar a cabo este proyecto en deuda estoy con ellos, y una disculpa por las molestias que genere, por la insistencia y la reiterada ayuda solicitada.

Más que mío, es el trabajo en conjunto, nuestro aprecio entre colegas y el querer buscar nuevas herramientas de trabajo.

¡Gracias!

## Índice:

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Ehrlichiosis.....	2
1.1.1 Epidemiología.....	3
1.1.2 Salud pública.....	4
1.1.3 Género <i>Ehrlichia</i> .....	5
1.1.4 <i>Ehrlichia canis</i> .....	6
1.1.5 Patogenia.....	9
1.1.6 Mecanismos moleculares de patogenicidad.....	10
1.1.7 Semiología.....	13
1.1.8. Prevención y control.....	15
1.2. Diagnóstico.....	15
1.2.2. Diagnóstico molecular.....	17
1.2.3. Importancia de un control positivo.....	18
2. Justificación.....	19
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivo general.....	20
4.1 Objetivos específicos.....	20
5. Material y Métodos.....	21
5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	21
5.2. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la identidad del fragmento amplificado.....	23
5.3. Sub-Clonación.....	24
5.4. Preparación de las células electro-competentes ( <i>Escherichia coli</i> HB101).....	24
5.5. Transformación de la cepa <i>E. coli</i> HB101.....	24
5.6. Cultivo y selección de las células transformadas.....	25
5.7. Extracción de plásmido.....	26
5.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar el gen <i>16sARN</i> .....	27
5.9. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la construcción.....	27
5.10. Ensayos de concentración mínima detectable y saturación de la reacción PCR.....	28
5.11. Estandarización de la PCR anidada.....	28

5.12. Muestras clínicas.....	30
5.13. Procesamiento de las muestras sanguíneas. ....	30
5.14. Extracción de ADN a partir del paquete leucoplaquetario.....	30
5.15. Análisis con el sistema <i>Ab Ehrlichia</i> <sup>®</sup> ( <i>Anigen</i> <sup>®</sup> ). ....	31
6. Resultados. ....	32
6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa. ....	32
6.2. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar el fragmento amplificado .....	35
6.3. Sub-clonación.....	36
6.4. Extracción de plásmido. ....	37
6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen <i>16sARN</i> . ....	38
6.6. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la construcción.....	39
6.7. Ensayos de concentración mínima detectable y saturación de la reacción PCR. ....	42
6.8. Estandarización de la PCR anidada. ....	43
6.9. Procesamiento de las muestras sanguíneas. ....	44
7. Discusión.....	56
8. Conclusiones.....	62
9. Prospectiva. ....	62
10. Referencias bibliográficas. ....	63
Anexo 1. Medios de Cultivo .....	72
Anexo 2. Soluciones.....	73
Anexo 3. Costos.....	75

## Índice de Figuras

Figura 1.	7
Figura 2.	7
Figura 3.	8
Figura 4.	8
Figura 5.	9
Figura 6.	10
Figura 7.	12
Figura 8.	32
Figura 9.	33
Figura 10.	33
Figura 11.	35
Figura 12.	35
Figura 13.	35
Figura 14.	36
Figura 15.	37
Figura 16.	37
Figura 17.	38
Figura 18.	40
Figura 19.	40
Figura 20.	41
Figura 21.	42
Figura 22.	42
Figura 23.	43
Figura 24.	44
Figura 25.	44
Figura 26.	48
Figura 27.	48
Figura 28.	49
Figura 29.	49
Figura 30.	50
Figura 31.	50
Figura 32.	51
Figura 33.	51
Figura 34.	52
Figura 35.	52
Figura 36.	53

## Índice de cuadros.

<b>Cuadro 1.</b> Iniciadores Externos.....	19
<b>Cuadro 2.</b> Iniciadores Internos.....	19
<b>Cuadro 3.</b> Reactivos y soluciones para la PCR y PCR anidada.....	20
<b>Cuadro 4.</b> Muestras de sangre utilizadas en el estudio.....	41
<b>Cuadro 5.</b> Resultados de la PCR y la serología de las muestras clínicas.....	49
<b>Cuadro 6.</b> Resumen de resultados de las 63 Muestras.....	50
<b>Cuadro 7.</b> Muestras positivas mediante la PCR a <i>Ehrlichia</i> spp. y <i>Ehrlichia canis</i> .....	50

## Abreviaturas

cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
°C	Grados Celsius
Fg	Femtogramos
G	Gramos
G	Gravedades
H	Hora
Kg	Kilogramos
kV	KiloVolts
Lb	Libras
L	Litros
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
μL	Microlitro
μF	MicroFaraday
Min	Minutos
Ng	Nanogramo
Nm	Nanometros
Ω	Ohms
Pb	Pares de bases
Pg	Picogramos
pM	Picomolar
pH	Potencial de Hidrógeno
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundo
U	Unidades
v/v	Volumen/volumen
V	Volts
%	Porcentaje

## Resumen

### **Acevedo-Monroy Salvador E. Estandarización de una PCR anidada para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis* en muestras clínicas de perros.**

(Bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo-Rodríguez, M. en C. Isidro Castro-Mendoza y M.V.Z. María Antonieta Mojica-Sánchez).

La ehrlichiosis es una enfermedad de distribución mundial causada por bacterias del género *Ehrlichia* y afecta principalmente mamíferos. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) la considera como una enfermedad de gran importancia, transmitida por diferentes especies de garrapatas. *Ehrlichia canis* tiene importancia en medicina veterinaria ya que por sus diferentes fases o estadios es complicado su diagnóstico, el estrecho contacto del humano con los animales la hace una potencial zoonosis. El diagnóstico de la Ehrlichiosis se basa en la historia clínica, el examen físico del paciente, pruebas de patología clínica y serológicas; éstas últimas son inespecíficas en la diferenciación de especies del género, estadio de la enfermedad y avances en la quimioterapia. El aislamiento de la bacteria no es una técnica común pues es costosa y tardada debido a que se debe hacer en diferentes líneas celulares las cuales requieren condiciones especiales para su cultivo y mantenimiento. El gen *16s rARN* codifica para una de la holoenzima del complejo de la subunidad pequeña 30S en los procariontes, y se encuentra presente en todas las bacterias con un número variable de copias. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una prueba de diagnóstico molecular bastante fidedigna con la capacidad de detectar cantidades mínimas hasta de picogramos de material nucleico (ADN) de la bacteria en cuestión, utilizar un fragmento del gen *16S rARN* hace específica a esta herramienta además, que este gen se reconoce como conservado dentro de las bacterias. También es útil para el reconocimiento de especies dentro del género. En la actualidad en nuestro país no existen pruebas moleculares para el diagnóstico de esta enfermedad accesibles para el clínico. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR anidada basada en la detección del gen ya mencionado y posteriormente, construir un control positivo a la PCR, en una bacteria que pudiera cultivarse en condiciones de laboratorio accesibles y no complejas. Para ello, posterior a la amplificación de un fragmento del gen se insertó en un sistema de clonación comercial pTZ157RT® y se transformó con este plásmido una cepa de *Escherichia coli* HB101, que al aplicar la técnica de extracción de plásmido y este material nucleico al someterlo a la PCR se obtuvo la amplificación de dicho fragmento. Se determinó que 500 pg es la mínima cantidad de ADN detectable por la PCR. Se confrontó la prueba con muestras sanguíneas de perros clínicamente diagnosticados con *Ehrlichia canis*, se logró la amplificación del fragmento en algunas de ellas. También se compararon los resultados de la PCR con un estuche comercial basado en la detección de anticuerpos, se obtuvieron resultados satisfactorios para que la prueba sea útil en el diagnóstico de la Ehrlichiosis.

# 1. Introducción

## 1.1 Ehrlichiosis

La Ehrlichiosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Ehrlichia*, son transmitidas por vectores, como las garrapatas, de diferentes géneros.<sup>1,2</sup>

Tiene una distribución mundial, se asocia principalmente a mamíferos como cánidos, felinos, ratones, rumiantes, equinos, por mencionar algunos. En el humano se han identificado enfermedades causadas por especies del género, *E. sennetsu* causante de la fiebre de Sennetsu y *E. chaffensis* causante de la Ehrlichiosis monocítica humana.<sup>1</sup> También se han descrito infecciones por parte de *E. canis* y *E. ewingi*. En el caso de *E. canis* fue causada por el contacto del ser humano con perros y los parásitos transmisores de la bacteria.<sup>3,4,5</sup>

Se han referido infecciones con el género *Ehrlichia* en diversas especies animales por ejemplo; *E. risticii*, agente etiológico de la fiebre equina del Potomac o Ehrlichiosis monocítica equina.<sup>1</sup>

En rumiantes se han reportado tres especies, *E. ondiri*, *E. ovina* y *E. ruminantium* la primera responsable de la Fiebre petequial bovina, la segunda genera la Ehrlichiosis ovina, mientras que *E. ruminantium* causa la Cowdriosis.<sup>1</sup>

En los caninos se conoce desde 1935 la existencia de *E.canis* principal agente etiológico de la Erliquiosis Monocítica Canina (EMC) ,<sup>6</sup> infecta a perros domésticos y cánidos salvajes (lobos, coyotes, dingos, licaones, zorros) y se ha identificado también en otras especies como en gatos.<sup>7</sup>

En cualquiera de los organismos en los que se ha encontrado se han descrito tres fases, aguda, sub-clínica y crónica.<sup>8,9</sup>

### **1.1.1 Epidemiología**

*Ehrlichia canis* fue descrita por primera vez en 1935 en Argelia,<sup>6</sup> actualmente se reconoce que tiene una distribución mundial. Fue reportada en los Estados Unidos de América (EUA) en 1963 y recibió reconocimiento como un patógeno de importancia veterinaria después de los brotes en los perros militares británicos en Singapur en 1963 y en los perros militares de EUA en Vietnam, lo que se tradujo en aproximadamente doscientos perros muertos en un período de 4 años.<sup>10</sup>

En 1987 se identificó por primera vez la infección en humanos producida por *E. canis*, en un hombre de 51 años en la zona rural de Arkansas Estados Unidos.<sup>3</sup>

En México se informó por primera vez la presencia de la bacteria en 1996 en perros del Distrito Federal, posteriormente se han documentado infecciones en humanos, algunas de ellas por el estrecho contacto con perros y los parásitos vectores de la bacteria lo cual hace necesaria la existencia de pruebas que confirmen la presencia de este microorganismo.<sup>11</sup>

Se desconoce la situación epidemiológica mexicana de la Ehrlichiosis, escasos trabajos se han realizado en el país. Los estudios más representativos son los que se llevaron a cabo en Yucatán y en la comarca Lagunera (Torreón, Coahuila y Gómez Palacio, Lerdo Durango).<sup>12,13</sup>

*Ehrlichia canis* es el principal agente etiológico de la Erlichiosis Monocítica Canina (EMC), tiene un ciclo de vida que involucra las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, permanece en el entorno silvestre por la infección persistente de caninos salvajes y el contacto de animales domésticos con los parásitos vectores.<sup>10</sup>

En México la presencia de *E. canis* no es de reporte obligado, como la de especies del género, las cuales están contenidas en el Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos, las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.<sup>14</sup>

### **1.1.2 Salud pública.**

En los últimos años *Ehrlichia* es un género que ha tomado importancia en la salud pública,<sup>3,4,5</sup> en años anteriores se han publicado trabajos en los cuales, a partir de muestras de caninos se ha detectado ADN de diferentes especies del género *Ehrlichia* así como *Anaplasma*, estas infecciones se dieron por una sola especie del género o por más en un mismo individuo lo cual hace evidente el riesgo existente para el humano al convivir con mascotas y más si no se tiene la precaución de controlar las parasitosis externas en sus animales.<sup>10</sup>

En la década de 1980 se tuvo el primer informe de Erlichiosis humana causada por la especie *E. canis*, posteriormente otras publicaciones han dado a conocer el mismo hallazgo en diversas partes del planeta.<sup>3</sup>

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) reportó que en 2010 existían 2.5 casos por millón de personas, la

incidencia de los casos incrementó en los meses de mayo a agosto en el periodo de 1994 a 2010 y en el periodo de 2000 a 2010 los grupos de riesgo reconocidos fueron personas de 60 a 64 años de edad, estos datos se refieren a *Ehrlichia* spp. El diagnóstico fue clínico y con apoyo de pruebas serológicas las cuales son incapaces de discernir entre especies del género.

### **1.1.3 Género *Ehrlichia*.**

Se trata de bacterias clasificadas como  $\alpha$ -proteobacterias, del orden de los Rickettsiales, este orden se divide en dos familias *Anaplasmataceae* y *Rickettsiaceae*. El género *Ehrlichia* pertenece a la familia *Anaplasmataceae* y está compuesto por las especies *E. chaffensis*, *E. sennetsu*, *E. ovina*, *E. risticii*, *E. ruminantium*, *E. ewingi* y *E. canis* todas causantes de enfermedades.<sup>15</sup>

Son bacterias intracelulares obligadas y pueden replicarse en líneas celulares de los hospederos. Carecen de peptidoglucano (PG) y lipopolisacárido (LPS), su pared está compuesta principalmente de colesterol el cual, se propone que toma a partir de la célula del hospedero.<sup>15</sup>

Para aislamiento, cultivo y mantenimiento de la bacteria son necesarias líneas celulares de macrófagos como Thp1, DH82, J774.1.A la cual puede tardar de 7 días hasta un mes.<sup>15</sup>

Su fuente de energía probable son los aminoácidos, no se han identificado enzimas o transportadores para el metabolismo de carbohidratos.

La infección o mantenimiento en la garrapata es todavía incierta, se ha descrito en líneas celulares de origen artrópodo que la bacteria es metabólicamente más activa comparada con líneas celulares de mamíferos, lo cual supone que en

hospederos mamíferos la bacteria depende totalmente de la maquinaria celular para subsistir.<sup>16, 17</sup>

Se identificó la actividad del sistema de secreción tipo IV, en las células de garrapata cuya regulación fue superior que en las de mamífero, lo que hace suponer que la bacteria debe activar *mecanismos* de infección más complejos en los insectos artrópodos que en los hospederos mamíferos.<sup>17</sup>

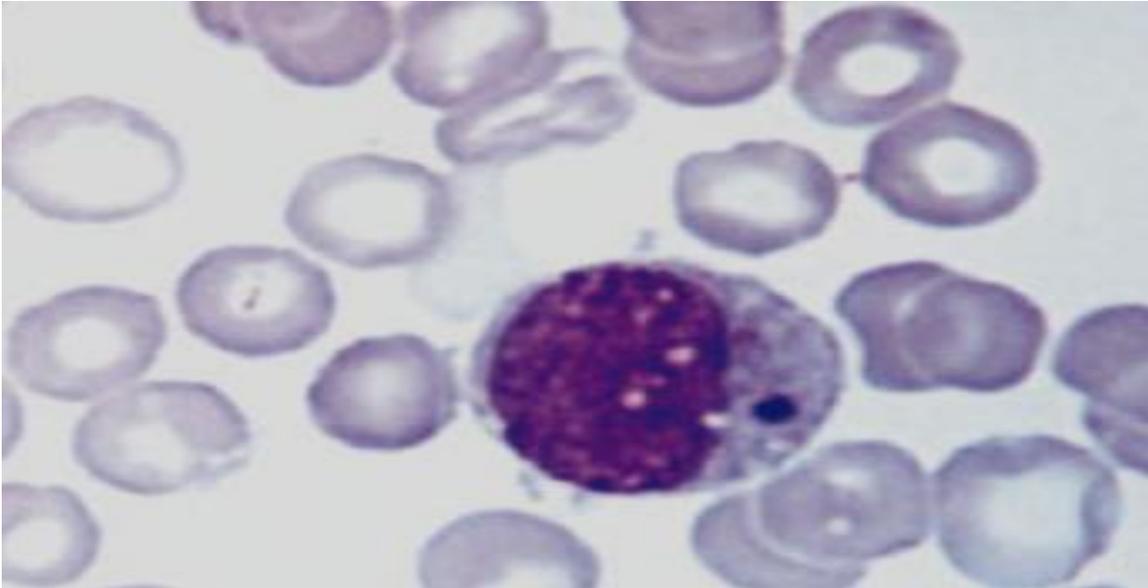
#### **1.1.4 *Ehrlichia canis***

*Ehrlichia canis* es una bacteria dimórfica, carente de LPS y PG, intracelular obligada; transmitida principalmente por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

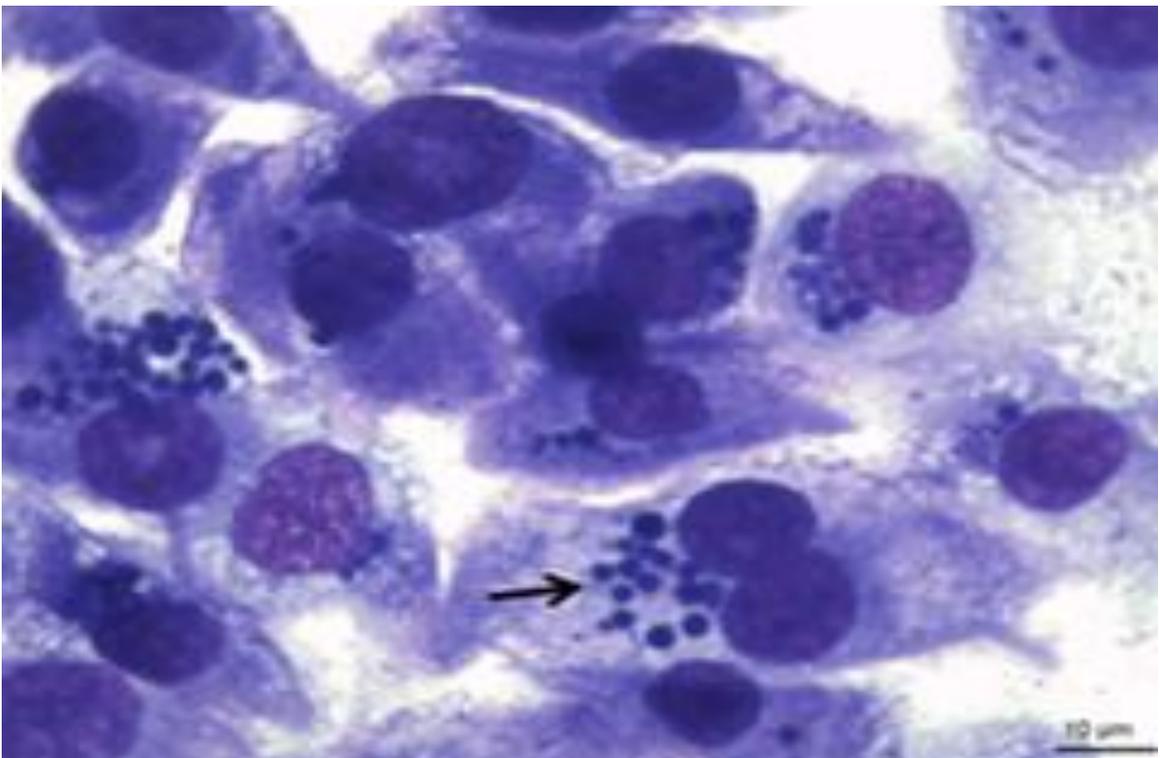
*Ehrlichia canis* reside dentro de monocitos y macrófagos de hospederos mamíferos formando micro-colonias dentro de una vacuola intracelular de membrana llamada mórula **Figuras 1-4.**<sup>15, 16, 17, 18,19,22</sup>

Es un organismo aerobio incapaz de utilizar la glucosa o fructosa como fuente de energía, no se han identificado los sistemas de transporte y enzimas esenciales para la utilización de estos sustratos. Se han identificado transportadores de aminoácidos y enzimas para la utilización de aspartato, prolina, glutamato, glutamina, arginina, lo que sugiere que los aminoácidos constituyen la fuente de energía y de carbono principal para *E. canis*.<sup>15</sup>

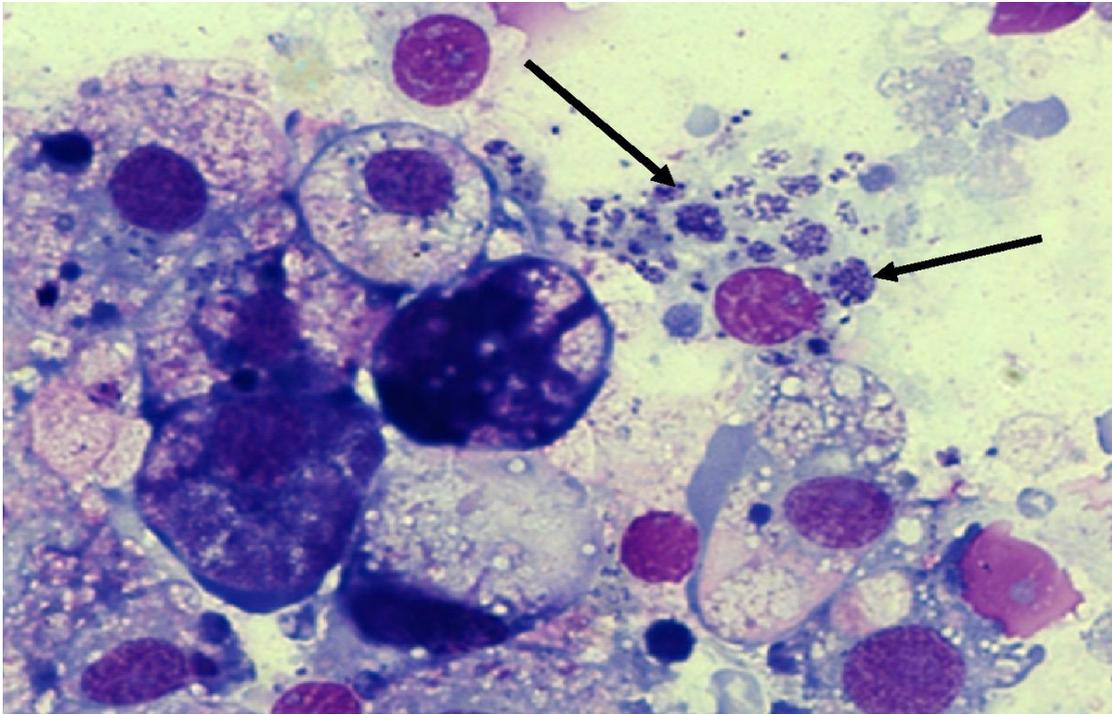
Se ha detectado un sistema de secreción tipo IV en bacterias del género *Ehrlichia* del cual aún se está dilucidando su función específica en la virulencia, se sabe que tiene relación estrecha con la supervivencia dentro del hospedero celular.<sup>15, 16</sup>



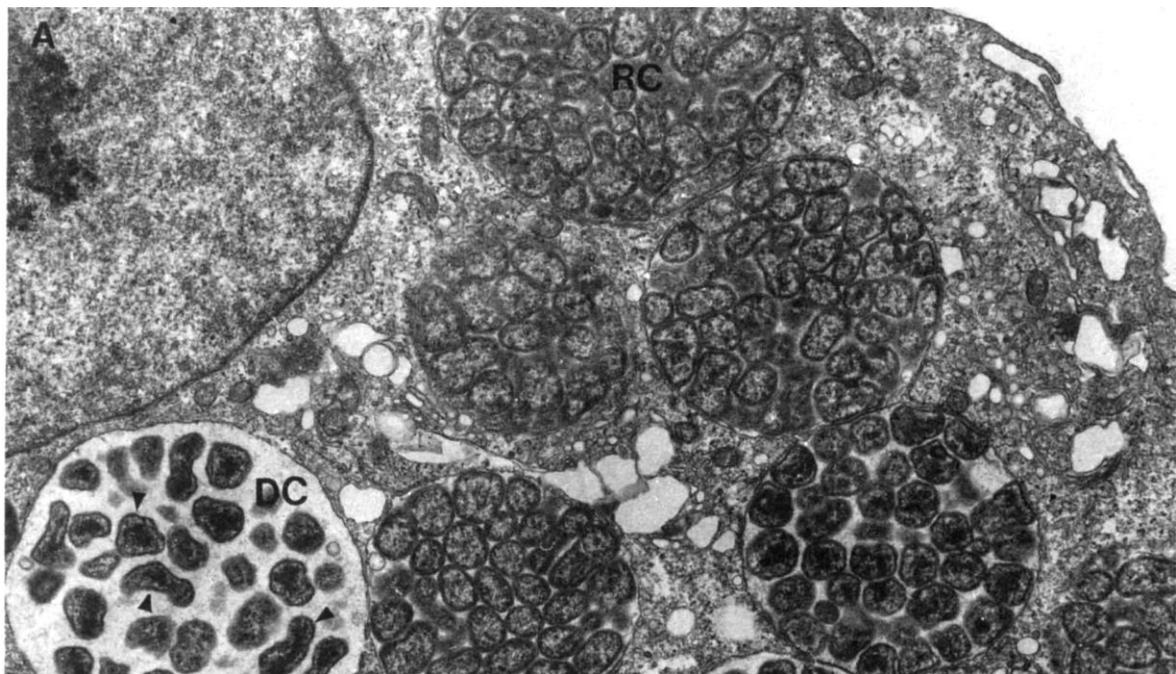
**Figura 1.** Micrografía de un macrófago infectado con *Ehrlichia canis* cepa Jaboticabal obtenido a partir de un perro experimentalmente infectado Utilizando tinción de Giemsa.<sup>19</sup>



**Figura 2.** Micrografía de *E. canis* en la línea celular DH82, la flecha indica las morulas de *E. canis*.<sup>20</sup>



**Figura 3.** Infección por *Ehrlichia canis* en la línea celular de garrapata RSE8.<sup>21</sup>

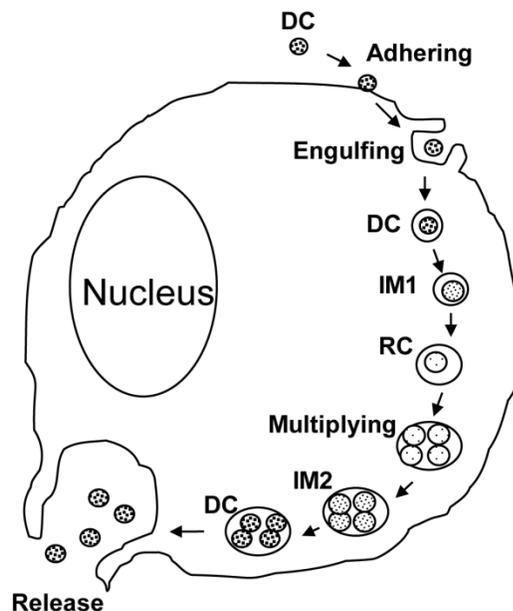


**Figura 4.** Ultraestructura *E. canis* (Cepa Oklahoma) en línea celular DH82. Bar = 0.5  $\mu$ m. A, El citoplasma contiene ocho mórulas contenedoras de *Ehrlichia* y sea células reticuladas ó núcleos densos (DC) en una mórula hay formas irregulares (puntas de flecha).<sup>22</sup>

### 1.1.5 Patogenia.

El estudio de *Ehrlichia* es relativamente reciente y aún están dilucidándose la patogenia y sus factores de virulencia, poco se conoce de los eventos que lleva a cabo en el vector, y qué *mecanismos* activa desde la vía de entrada causada por la mordedura de la garrapata al hospedero, hasta su adhesión a los monocitos o macrófagos, también existen múltiples teorías de la infección entre los parásitos vectores.<sup>23</sup>

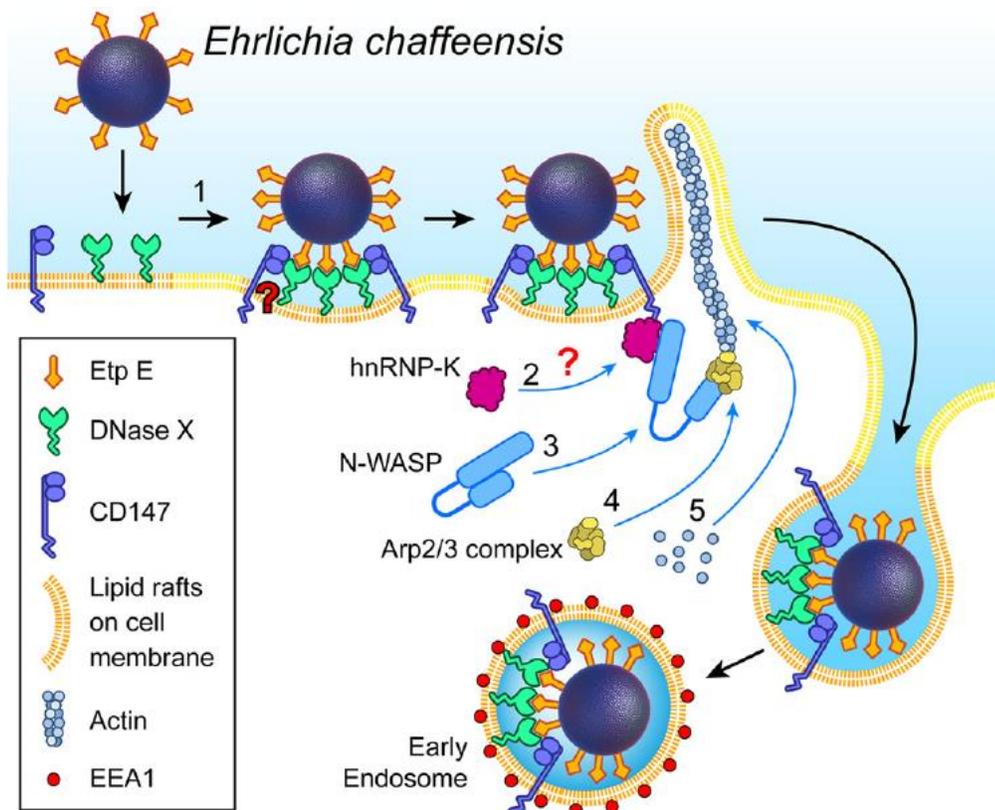
Se sabe que la bacteria tiene un ciclo muy parecido al de *Chlamydia* en la célula hospedera ya que, la bacteria forma núcleos densos al entrar y salir de la célula, y células reticulares los cuales maduran dentro de la célula hospedera, esto se aprecia en la Figura 5.<sup>17</sup>



**Figura 5.** Ciclo de desarrollo de *E. chaffeensis* en la célula huésped eucariota. Núcleo Denso Infeccioso (DC) entra a la célula mediada por un receptor, 1 hora después de la entrada se transforma en Intermedio (IM1) después en Célula Reticular (RC). Durante las próximas 48 horas RC se replica, duplicándose cada 8 horas, y luego se transforma en IM-2 y madura de DC dentro de 72 horas después del contacto inicial de la célula.<sup>17</sup>

### 1.1.6 Mecanismos moleculares de patogenicidad.

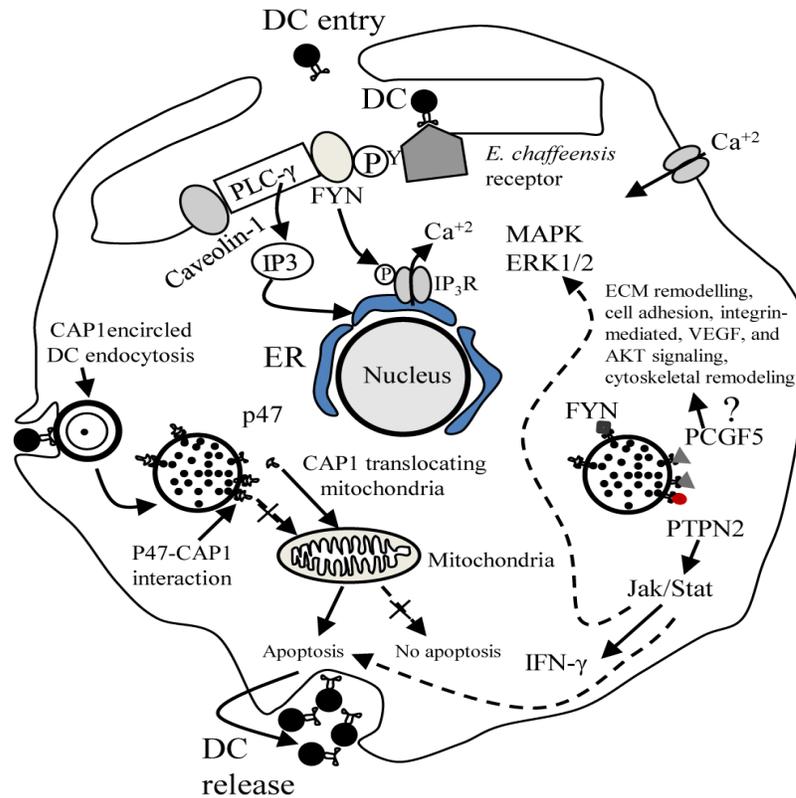
Diversos grupos de investigación han puesto su atención en los eventos de adhesión e invasión. Rikihisa y colaboradores han propuesto un modelo de adhesión que involucra a las balsas lipídicas y los receptores contenidos en ellas como lo son DNasa X, el cual es objetivo de la EtpE (proteína que facilita la entrada de *Ehrlichia*) y que al ligarse a DNasa X interactúa con otras proteínas que llevan a cabo cascadas de fosforilación e internan a la bacteria llevando a cabo polimerización de la actina en la membrana celular, Figura 6.; todos estos trabajos se han establecido en la especie *E. chaffeensis*, en las líneas celulares Thp1 y DH82.<sup>24, 25</sup>



**Figura 6.** Modelo del mecanismo de vía de entrada de *E. chaffeensis* mediado por Dnasa-X la cual interactúa con CD147 y hnRNP-K subsecuentemente lleva a cabo polimerización de actina dependiente de N-WASP. (1) *E. chaffeensis* Extracelular utiliza la región C-terminal de su proteína de superficie EtpE como ligando a DNasa X en la superficie de la célula hospedadora (2) Una vez unida EtpE a Dnasa-X, la redistribución lateral de DNase X dentro de las balsas lipídicas dinámicas trae a CD147 en asociación con el complejo EtpE-Dnasa-X. (3) CD147 potencialmente retransmite la señal al lado citoplásmico de la membrana celular y recluta hnRNP-K para unir N-WASP, lo que lleva a la activación de N-WASP (cambio conformacional). (4)<sup>21</sup>

El evento de adhesión, como en todas las bacterias patógenas es la clave de inicio de una infección, así como la internación, colonización y supervivencia de los parásitos intracelulares. Se aprecia en la imagen de la Figura 6 la adquisición de marcadores de endosoma temprano en el compartimiento de replicación de *Ehrlichia*, como lo son Rab5 y Antígeno de endosoma temprano 1 (EEA1). También se ha documentado que en este compartimiento hay acumulación de transferrina y receptores de transferrina (TfR), los cuales adquiere después de su ingreso a la célula.

En 2009 McBride y Walker publicaron una revisión en donde conjuntaban en ese momento hasta la fecha los avances conocidos en la patobiología molecular de *Ehrlichia* donde, basados en otros trabajos proponen un modelo del tránsito intracelular de la bacteria en el monocito, induciendo múltiples cascadas de fosforilación y desfosforilación, donde interactúa la proteína de *E. chaffeensis* TRP47, *E. canis* tiene una proteína ortóloga que es TRP36, como se observa en la Figura 7. Esto sugiere que debe ocurrir apoptosis para la salida de la bacteria en búsqueda de otra célula para llevar el ciclo. Estos dos autores también sugerían que una posible proteína de adhesión y entrada de la bacteria podía ser TRP120, la cual *E. canis* posee un ortólogo que es TRP140,<sup>17</sup> esto fue refutado en 2015 por Rikihisa *et al.* quienes proponen que en células confluentes *Ehrlichia* se disemina entre ellas por la extensión de filopódios.<sup>24, 25</sup>



**Figura 7.** Un modelo propuesto de la función efectora TRP47 en *E. chaffeensis* infección de los macrófagos con base en estudios anteriores. La unión de los receptores para unión de *Ehrlichia chaffeensis* a su receptor, directa o indirectamente activa a FYN. FYN tirosina quinasa fosforila y activa a PLC-γ, el cual hidroliza al fosfolípido de membrana PIP2 (fosfatidil inositol bifosfato), resultando en un incremento de IP3 (inositol 1, 4, 5 trifosfato) y liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico. FYN también fosforila caveolina-1 involucrada en la entrada de *Ehrlichia*. La interacción de TRP47-PTPN2 (Proteína tirosina fosfato no receptora tipo 2) modula los eventos de señalización ejerciendo retroalimentación negativa en la vía Jak/Stat, esto por desfosforilación de Jak y Stat involucrados en el mantenimiento y sobrevivencia de *E. chaffeensis*, la interacción de TRP47-PCGF5 (polycomb group ring finger 5) modula la interacción de genes asociados con la señalización y remodelamiento del citoesqueleto, facilitando y manteniendo la sobrevivencia intracelular de *E. chaffeensis*, CAP1 (adenilato ciclasa asociada a la proteína 1) promueve el dinamismo rápido de actina en conjunto con Cofilina/ADF (Factor de despolimerización Actina) y es requerido para la morfología celular, migración y endocitosis. El transporte mitocondrial de CAP1 promueve la apoptosis dependiente de actina y cofilina, el cual puede tener un papel importante en la salida del núcleo denso (DC) de *Ehrlichia* del monocito.<sup>17</sup>

Se ha expuesto, también a la apoptosis como un evento controlado por la bacteria para su mantenimiento en la célula, evitándolo de tal manera que la bacteria pone en función un sistema de secreción tipo IV el cual exporta a la mitocondria la proteína ECH0825 de *Ehrlichia*, frenando la apoptosis mediada por Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), esto lo hace sobre-regulando a Superóxido Dismutasa Mitocondrial de Manganeso (MnSOD).<sup>26, 27, 28</sup>

Un sistema de secreción más descrito en *Ehrlichia* es el tipo I, el cual se supone que secreta Ank200, proteína la cual se sugiere que está involucrada en el tránsito intracelular e interacción con proteínas mediadoras de la apoptosis.<sup>29</sup>

### **1.1.7 Semiología.**

La EMC, también es conocida como Pancitopenia Tropical. Clínicamente, las infecciones por *E. canis* progresan en tres fases: sub-clínica, aguda y crónica.

Los signos más frecuentes en la fase aguda son: pirexia, hiporexia, letargo, debilidad, secreción óculo-nasal de tipo seroso, diarrea, disnea, ligera pérdida de peso, en la revisión por parte del clínico se puede detectar esplenomegalia.<sup>8, 9, 26</sup>

Los signos relacionados con hemorragia son aparición de petequias dérmicas, equimosis y epistaxis.<sup>30</sup>

Las lesiones oftálmicas más frecuentes en esta fase son uveítis anterior, edema de la papila ocular, infiltrados vasculares en retina, coriorrenitis, ceguera como resultado de la hiper-viscosidad sanguínea y debido a ello hay hemorragia sub-retinal a causa de ello la retina se desprende.<sup>30</sup>

También en esta fase se han documentado signos nerviosos debido a la hemorragia en meninges.

Las alteraciones más frecuentes en estudios de laboratorio son anemia no regenerativa, trombocitopenia y pancitopenia.<sup>30</sup>

En perros experimentalmente la trombocitopenia se desarrolla al día 10 de la infección.<sup>30</sup>

La fase sub-clínica ocurre de 6 a 9 semanas posterior a la infección cuando existe recuperación de los perros, sin haber presentado signos clínicos durante uno a cuatro meses.<sup>30</sup>

En esta fase se han descrito; una leve trombocitopenia, y disminución de leucocitos y eritrocitos.<sup>30</sup>

La fase crónica se caracteriza por pérdida progresiva de peso, anorexia y palidez de las mucosas, en el 50% de estos casos se observa epistaxis característica de esta enfermedad dentro de la etapa crónica, a diferencia de la etapa aguda, los signos se tornan más severos.<sup>30</sup>

Existen hallazgos de trombocitopenia, anemia y leucopenia severas, debido a hipoplasia de la medula ósea lo que la hace distintiva de las otras dos fases.<sup>30</sup>

La demostración de este organismo en frotis sanguíneos teñidos con alguno de los colorantes de Giemsa tiene un 60% de sensibilidad, observando así las mórulas contenedoras del organismo sin embargo, esta evaluación consume un tiempo de 50-60 minutos por laminilla. Los hallazgos muy importantes en los frotis son

eritrofagocitosis y trombofagocitosis. Sin embargo gránulos azurofiros y material nuclear fagocitado puede ser confundido con una mórula.<sup>30</sup>

### **1.1.8. Prevención y control.**

Actualmente, no se cuenta con vacunas comercialmente disponibles contra la Ehrlichiosis en especie alguna, se han desarrollado experimentalmente prototipos de cepas atenuadas las cuales inducen inmunidad, pero aún no se han comercializado.<sup>31, 32, 33</sup>

Lo idóneo para la prevención de la enfermedad es evitar el establecimiento del vector, por ello en zonas de alta prevalencia la vigilancia y desparasitación contra la garrapata es muy importante, empleando insecticidas, algunos ya ineficaces dada la resistencia adquirida por parte del parásito vector a ellos, tal es el caso de la ivermectina y sus derivados, se han utilizado también piretroides, organofosforados, organoclorados, permetrinas, amitraz y fipronil obteniendo resultados benéficos al principio de los tratamientos, sin embargo la garrapata adquiere resistencia a estos químicos.<sup>34</sup>

Lo anterior sugiere la importancia del desarrollo de un tratamiento eficaz contra estos parásitos vectores, lo cual incluye la profilaxis contra *Ehrlichia* spp.

## **1.2. Diagnóstico**

El diagnóstico clínico de la EMC se basa en la historia clínica y exploración física del paciente encontrando los signos clínicos mencionados.

Alteraciones en estudios clínicos como; hemograma y bioquímica sanguínea que pueden sugerir la infección por parte de *Ehrlichia*.

En la bioquímica sanguínea son frecuentes hipoalbuminemia, hipergammaglobulinemia, aumento en las proteínas; Alaninotransferasa (ALT) y Fosfatasa Alcalina (FA). En la fase aguda se observa un aumento de la proteína C reactiva.<sup>30</sup>

Se ha reconocido al pastor alemán como la raza más susceptible a la infección por parte de este organismo.<sup>30</sup>

En el humano pueden presentarse signos como cefalea, mialgia y fiebre, aunque también puede presentarse de manera asintomática.<sup>4, 5</sup>

Se han encontrado lesiones en el estudio *post-mortem* como linfadenomegalia, artritis y hemorragias en meninges.<sup>8,9, 30</sup>

Se han desarrollado pruebas de diagnóstico serológicas basadas en la detección de anticuerpos contra el microorganismo. En 1983 se estableció como una prueba de diagnóstico la Inmunofluorecencia Indirecta (IFA), posteriormente se han estandarizado pruebas que han sido comercializadas y cuyo fundamento es la búsqueda de anticuerpos, al detectarlos la prueba arroja un resultado colorimétrico. La desventaja de estas pruebas serológicas es reacción cruzada con diferentes especies del género.<sup>10</sup>

Los laboratorios que comercializan pruebas para el diagnóstico de esta enfermedad son IDEEX®, que ofrece la prueba rápida 4Dx® que además permite diagnosticar otras tres enfermedades transmitidas por vector que son, mediante la identificación de antígeno en filarisis y la detección de anticuerpos en,

anaplasmosis y borreliosis. Actualmente, es la que tiene mayor mercado en México.

Así mismo Bionote® a través de sus laboratorios Anigen® han lanzado al mercado la prueba Ab de *Ehrlichia*®, dando a conocer la detección únicamente de *Ehrlichia canis* por serología mediante la búsqueda de anticuerpos.

Zoetis® en 2015 comenzó a comercializar en México una prueba llamada WITNESS® que al igual que Anigen ofrece el diagnóstico serológico únicamente de *Ehrlichia canis* de igual manera detecta anticuerpos

En Jerusalén, Israel a partir de investigaciones basadas en la sensibilidad y especificidad de pruebas comerciales, el Dr. Shimon Harrus desarrolló una prueba serológica también basada en colorimetría, donde los antígenos son proteínas inmunogénicas de *Ehrlichia canis* arrojando resultados de mayor especificidad y sensibilidad en la búsqueda de anticuerpos, ante 4Dx® de IDEXX®, esta prueba es ImmunoComb®.<sup>35</sup>

### **1.2.2. Diagnóstico molecular.**

A principios de la década de 1990 se desarrolló la primera prueba de diagnóstico molecular para *Ehrlichia canis*, el grupo de Wen en 1994 usando el gen *16sARNr* de la bacteria desarrollo una PCR anidada con la capacidad de detectar *Ehrlichia* y diferenciar *E. canis* de cualquiera de las otras, con especificidad y sensibilidad superior a la IFA.<sup>10</sup> Esta prueba realizó con diversas variantes, basándose en el mismo fragmento de gen, en 1997 el grupo de Harrus logró detectar ADN de *Ehrlichia* 34 meses después de la infección experimental,<sup>36</sup> en el año 2001 Hisashi

Inokuma y su grupo utilizaron un fragmento del gen citrato sintasa como herramienta de diagnóstico vía PCR y para filogenia.<sup>37</sup> En 2002 Rikihisa y su grupo desarrollaron una PCR anidada para detectar un fragmento del gen *30-p* específico de *E. canis*, más sensible que la de *16sARNr*.<sup>38</sup>

En 2008 Arnon Gal y colaboradores, desarrollaron una PCR *touchdown* de muestras de perros basándose en la secuencia *16sARNr* realizaron, obtenidas en la necropsia.<sup>39</sup>

En México Rodríguez Vivaz y colaboradores utilizando la PCR anidada estandarizada por Wen y colaboradores, detectaron *Ehrlichia canis* en muestras de perros de Yucatán.<sup>13</sup>

Otro trabajo representativo en México fue el de Almazán en 2015, que utilizó en conjunto el gen *16sARNr* y *TPR36* para detectar y caracterizar *E. canis* y *Anaplasma platys* en perros.<sup>12</sup>

### **1.2.3. Importancia de un control positivo.**

*Ehrlichia canis* es una bacteria intracelular obligada, por ello que el aislamiento del organismo es complicado, puesto que el costo y tiempo por la inversión, reproducción y el mantenimiento de una línea celular para el aislamiento o replicación de la bacteria es prolongado y caro, además de la necesidad de instalaciones propicias para estas técnicas requiere de una gran infraestructura y el evento único del diagnóstico no es una fuente de ingresos para sustentar tales procedimientos. (Anexo 3.)

Para tener un control positivo para la PCR de alguna bacteria existen distintas maneras de obtener el ADN, a) un aislado bacteriano a partir de una muestra clínica. b) a partir de la bacteria adquirida de manera comercial.

En ello radica la importancia del desarrollo de un control positivo, el cual se encuentre contenido en un vector y que pueda ser introducido a una bacteria con condiciones más simples de cultivo y que genere indefinidamente el templado de ADN deseado. Esto a su vez simplifica la extracción del material nucleico.

Estos últimos procedimientos reducen los costos y hacen disponibles pruebas diagnósticas para el clínico.

## **2. Justificación**

Actualmente en México no hay pruebas de diagnóstico moleculares que sean accesibles de manera económica para el clínico. También la dificultad del aislamiento hace necesario un método de diagnóstico alternativo.

La PCR, al detectar cantidades de ADN hasta de picogramos, la hace una herramienta útil para el diagnóstico y el seguimiento de pacientes tratados, así como para corroborar el éxito de la quimioterapia antimicrobiana.

## **3. Hipótesis**

Un fragmento de ADN de *Ehrlichia canis* podrá ser utilizado como control positivo para una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de ehrlichiosis.

## 4. Objetivo general

Construir un control positivo de *Ehrlichia canis*, clonando un fragmento del gen que codifica para la fracción 16S de *Ehrlichia* spp. en *Escherichia coli*, obtenido por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada para *Ehrlichia canis* con la finalidad de estandarizar una prueba de diagnóstico molecular de erliquiosis canina por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### 4.1 Objetivos específicos

- Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *Ehrlichia* spp. y para *Ehrlichia canis* utilizando iniciadores ya reportados.
- Sub-clonación en un vector comercial para la transformación de la cepa de *Escherichia coli* HB101.
- Procesamiento de muestras clínicas para comparar las pruebas serológicas comerciales existentes con la Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada.

## 5. Material y Métodos

### 5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se realizó una primera PCR (PCR externa) para detectar el gen *16s ARNr* del género *Ehrlichia*, como lo describió Wen *et al.*, utilizando los iniciadores:

**Cuadro 1.** Iniciadores Externos

Iniciador	Secuencia
ECC	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'
ECB	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'

Posteriormente se llevó a cabo una PCR anidada con los iniciadores:

Iniciador	Secuencia
HE-3	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'
ECA	5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3'

**Cuadro 2.** Iniciadores Internos

Estos iniciadores están diseñados para amplificar un fragmento del mismo gen pero específico para *E. canis*. Ambos juegos de iniciadores se alinearon con el programa BLAST-Primer del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con secuencias reportadas en otros organismos.

Las condiciones para la amplificación fueron 94 °C/5 min, después 40 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C /1 min, y 72 °C/1 min., una extensión final de 72°C / 5 min

Como control positivo se utilizó al ADN obtenido partir de un vector que contiene el fragmento del gen *16sARN*, donado por el Dr. Jesús Jaime Hernández Carreño de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Se obtuvieron fragmentos de 478 bp y 389 pb, este último fue obtenido a partir de la PCR anidada del primer fragmento. <sup>10</sup>

Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% mediante electroforesis con solución TAE y visualizados en un digitalizador (Minilumi®).

Posteriormente, en la estandarización las constantes de la reacción se modificaron con el fin de elevar la astringencia de la prueba y eliminar la detección de bandas inespecíficas en el gel y barrido en la electroforesis.

Las condiciones que se utilizaron fueron:

94 °C/5 min, después 40 ciclos de: 94 °C/1 min, 62 °C /1 min, y 72 °C/30 s., extensión final de 72°C 5 min con los iniciadores externos.

94 °C/5 min, después 40 ciclos de 94 °C / 40 s, 62 °C / 40 s, y 72 °C / 40 s., extensión final de 72°C 5 min con los iniciadores internos respectivamente. Para esta reacción el producto obtenido a partir de la primera se diluía 1:10 y a partir de esta dilución se llevaba a cabo la reacción como se indica abajo. En el caso del control positivo se encontraba en una concentración de 100 ng/μL.

H <sub>2</sub> O.....c.b.p.50 μL:	33.5 μL
Buffer 10X.....	5 μL
MgCl <sub>2</sub> .....	3.5 μL
DNTP's.....	1 μL
Iniciador en sentido.....	1 μL
Iniciador antisentido.....	1 μL
ADN.....	4 μL
Polimerasa ( <i>Taq</i> ).....	1U
Volumen total.....	50 μL

**Cuadro 3.** Reactivos y soluciones para la PCR y PCR anidada.

## **5.2. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la identidad del fragmento amplificado.**

Para verificar que el amplificado correspondía al fragmento esperado de *E. canis* se realizó una digestión con las enzimas de restricción *AluI* y *SspI*, (Gibco®). Previamente se llevó a cabo un ensayo *in silico* en el programa SerialCloner® v2.6.1. para conocer los fragmentos a obtener y después efectuar el protocolo de digestión.

Como referencia para realizar el ensayo *in silico* se le proporciono al software la secuencia: Ecaj\_R0013 reportada, en el NCB, específica para *Ehrlichia canis*.

El ADN amplificado se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. Posteriormente en un tubo cónico con capacidad para 0.6 mL (Axygen®) se colocaron 0.6 µL de enzima (1 U), el ADN (1 µg) y el buffer correspondiente para cada enzima (4 µL). La reacción se incubó por 1 h a 37°C en baño María. Después de inactivar la enzima a (-) 20°C, se observó el perfil electroforético en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X aplicando 60 Volts durante 1 h para posteriormente ser teñidos con Bromuro de Etidio y observados a través del fotodocumentador (MiniLumi, Bio Imaging Systems®).

El tamaño de los fragmentos se comprobó con los ensayos de restricción, obteniendo fragmentos de 165, 105, 75 y 42 pb en el caso de *AluI*, 284 y 105 pb con *SspI* respectivamente.

### **5.3. Sub-Clonación.**

Después de comprobar el tamaño del fragmento obtenido en la PCR a partir del vector clonado, este fue sub-clonado en el plásmido vector del sistema InstATclone PCR Cloning Kit® (Thermo Scientific®), denominado pTZ57R/T, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.<sup>36</sup>

### **5.4. Preparación de las células electro-competentes (*Escherichia coli* HB101)**

Se utilizó la cepa de *E. coli* HB101, para transformarla con el plásmido que contiene el inserto de interés.

La cepa se sembró en agar Luria-Bertani (LB) por el método de aislamiento en cultivo puro, incubándose a 37°C durante 24 h, a partir de este cultivo, se sembraron cinco colonias en caldo LB con las siguientes condiciones; 37°C con agitación constante de 120 rpm y se midió la absorbancia del cultivo cada hora hasta llegar a una densidad óptica (O.D., por sus siglas en inglés) de 600 nm, lo cual ocurrió a las 4.5 h.

Al llegar a la O.D. deseada, el cultivo se enfrió a 4°C para detener el metabolismo bacteriano. El cultivo se centrifugó a una velocidad de 4500 rpm/ 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se reconstituyó en agua inyectable fría con 10% de glicerol, este paso se repitió por dos ocasiones.<sup>41</sup>

Al final se obtuvo una pastilla bacteriana la cual se suspendió en 1 mL de agua con 10 % de glicerol y se fraccionó en viales con 250 µL cada uno. Y se almacenó a (-) 20°C para su uso posterior.

### **5.5. Transformación de la cepa *E. coli* HB101.**

Para la transformación se descongelaron en hielo los tubos con células electrocompetentes y fueron colocadas en celdas de electroporación frías. Se añadieron 4  $\mu\text{L}$  de la ligazón, plásmido y fragmento junto con las células electrocompetentes.

Se colocó cada una de las celdas en el electroporador (BioRad®) y se les dió un pulso a 25  $\mu\text{F}$  de capacitancia, 2.5 kV y 200  $\Omega$  de resistencia durante 4 seg.<sup>41</sup>

### **5.6. Cultivo y selección de las células transformadas.**

Inmediatamente después de la descarga eléctrica, se añadió 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente y se transfirió a un tubo de 1.5 mL (Axygen®) se incubaron durante 1 h a 37 °C a 100 rpm.

Después se sembraron en placas de agar LB con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina utilizando perlas de vidrio, se esperó hasta que el líquido estuviera evaporado y se incubaron a 37°C durante 18 h. Las colonias que crecieron se volvieron a sembrar en placas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina y fueron analizadas.

Posteriormente se seleccionaron las colonias que se desarrollaron en el medio y se resembraron en un agar con las mismas características empleando la técnica de cultivo puro, con el fin de eliminar bacterias con resistencia espontánea, esto bajo las mismas condiciones de incubación.

Las colonias que se desarrollaron en las placas de agar se sembraron en caldo LB con ampicilina y se les realizó extracción de plásmido.<sup>41</sup>

## 5.7. Extracción de plásmido.

Se realizó el método de extracción de plásmidos Maxi-prep de lisis alcalina descrito por Sambrock, con algunas modificaciones (anexo 2).<sup>41</sup>

Las colonias se sembraron en 2 mL de caldo LB + 100 µg/mL de ampicilina, se incubaron durante 12-18 h en agitación a 220 rpm. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se decantó el medio. La pastilla bacteriana se suspendió en 100 µL de solución I, se homogeneizó en vortex y se mantuvo a temperatura ambiente (19-25°C) durante 10 min, después se agregaron 200 µL de solución II recién preparada y se mezcló con pipeteo suave hasta que la solución aclaró y se volvió viscosa. Se colocó en hielo por 10 min al término de los cuales se agregó solución III mezclando con vortex invirtiendo el tubo durante 10 seg, se mantuvo 5 min en hielo y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, el ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol e incubando durante 1 h en hielo. Después se centrifugó a 12 000 rpm/5 min a 4°C en microcentrífuga (Labnet®), se decantó el isopropanol y la pastilla se limpió con 1 mL de etanol frío al 70% mediante centrifugación a 12 000 rpm/5 min a 4°C. Una vez que el comprimido se deshidrató, fue suspendido en agua Mili Q® estéril y almacenado a -20°C hasta su utilización.

## **5.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar el gen 16sARN**

Para comprobar que el inserto 16sARN de *Ehrlichia* spp. y *E.canis* se encontraba en el vector se realizó la PCR con los iniciadores y condiciones antes mencionadas.

Como template se utilizó el ADN extraído a partir de la extracción de plásmido producto de las clonas obtenidas

## **5.9. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la construcción**

Para verificar que el inserto se encontraba en el vector pTZ157RT se realizó una digestión con las enzimas de restricción *XbaI*, *SaI* (Thermo Scientific Fisher®) y *KpnI* (Gibco®). El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. En un tubo con capacidad para 0.6 mL se colocaron 0.6 µL de enzima (1 U), el ADN (1 µg) y el buffer correspondiente para cada enzima (4 µL). La reacción se incubó por 1 h a 37°C en baño María. Después de inactivar la enzima a (-) 20 °C y se observó el patrón electroforético en geles de agarosa al 1% en TAE 1X aplicando 60 volts durante 1 h y teñidos con Bromuro de Etidio a través del digitalizador.

Posteriormente, se realizó una digestión con las enzimas de restricción *AluI* y *SspI*, (Gibco®). El ADN amplificado se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. En un tubo con capacidad para 0.6 mL (Axygen®) se colocaron 0.6 µL de enzima (1 U), el ADN (1 µg) y el buffer correspondiente para cada enzima (4 µL). La reacción se incubó por 1 h a 37°C en baño María. Después de inactivar la enzima a -20°C.

La longitud de los fragmentos se comprobó con ensayos de restricción, utilizando enzimas de restricción que generan fragmentos de 165, 105, 75 y 42 pb en el caso de *AluI*, 284 y 105 pb con *SspI* respectivamente.

#### **5.10. Ensayos de concentración mínima detectable y saturación de la reacción PCR.**

Definida la identidad del plásmido, se realizaron diluciones del plásmido comenzando con 100 ng / $\mu$ L y continuando con 50 ng, 5ng, 500pg, 50pg, 5pg, 500fg, 50fg y 5 fg/ $\mu$ L.

Determinada la mínima concentración de ADN detectable por la reacción, se procedió a determinar la concentración a la cual la reacción se saturaba, evitando así la amplificación del fragmento. Se inició con una concentración de 64  $\mu$ g y se continuó con las concentraciones 32  $\mu$ g, 16  $\mu$ g, 8  $\mu$ g, 4 $\mu$ g, 3.5  $\mu$ g, 3  $\mu$ g, 2.5  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 1.5  $\mu$ g, 1 $\mu$ g 500 ng y 200 ng.

Todos estos ensayos se realizaron únicamente con el amplificado de los iniciadores externos.

#### **5.11. Estandarización de la PCR anidada.**

Se realizaron gradientes de temperatura y de magnesio de las reacciones con el fin de determinar en qué temperatura y concentración de iones se inhibe el alineamiento de los iniciadores. Para ello se programó el termociclador (SelectCycler®, Techne®) con temperaturas variantes de 55°C, 55.6, 56.2, 56.9, 57.5, 58, 58.6, 59, 59.4, 60°C, y para los gradientes de magnesio se disminuyeron las concentraciones del ión, la solución concentrada se encuentra a 50 mM, para

el protocolo de la reacción se agregan 5  $\mu\text{L}$ , se usaron cantidades de 5  $\mu\text{L}$ , 4.5  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 3.5  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  y 1.5  $\mu\text{L}$ .

Se llevó a cabo la purificación del fragmento externo previo al anidamiento de la reacción, de la siguiente manera, al producto de la primera amplificación se le agregó un volumen igual de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamilico, se agitó vigorosamente y se centrifugó 5000 rpm/15 segundos a temperatura ambiente por 3 min, se tomó el sobrenadante, transfirió a otro tubo, se le añadió 0.10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, se agitó vigorosamente, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó 15 min a (-) 80°C, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1mL de etanol al 70 % frío y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, la pastilla de ADN fue secada y reconstituida en agua.<sup>42</sup>

También se llevó a cabo la dilución del fragmento externo a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

Los dos últimos procedimientos se realizaron para corroborar la interferencia del exceso de iniciadores de la primera reacción.

Se llevó a cabo la reacción con los iniciadores internos con las condiciones arriba mencionadas.

### **5.12. Muestras clínicas.**

Se procesaron 53 muestras sanguíneas de perros de diferente sexo, raza y edad, provenientes de Colima, Veracruz, Ciudad de México y Estado de México, diagnosticados con *E. canis* por medio de la prueba 4 Dx de IDEXX®, y 10 muestras de sangre de animales clínicamente sanos.<sup>43</sup>

La muestra debía cumplir las siguientes características, mínimo 1mL sangre completa en tubo con anticoagulante (EDTA K<sup>+</sup>, citrato Na<sup>+</sup>, heparina o Alsever) en refrigeración.

### **5.13. Procesamiento de las muestras sanguíneas.**

De cada muestra se tomó 1mL, se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, el plasma se guardó en tubos de 600 µL y se almacenó en congelación a (-) 20°C.

Al paquete celular, se le agregó un volumen de agua inyectable fría y se homogenizó posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, se repitió el paso en dos ocasiones.<sup>44</sup> Al paquete celular blanco obtenido se le realizó extracción de ADN.

### **5.14. Extracción de ADN a partir del paquete leucoplaquetario.**

Se realizó la extracción de ADN por el método del tiocianato de guanidina descrito por Pitcher *et al.* con algunas modificaciones (anexo 2).<sup>45</sup>

A la pastilla leucoplaquetaria se le agregó 350 µL de solución de lisis, se agitó vigorosamente en un agitador de vórtice (Vortex®) posteriormente, se le agregó al homogenizado 150 µL de acetato de amonio helado, se invirtió el tubo por diez ocasiones y se incubó a -20°C durante 20 min. Terminado este tiempo se

agregaron 500  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamilico y se agitó vigorosamente en un agitador de vórtice, la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo. Este paso se repitió una vez más. La fase acuosa obtenida de este proceso fue precipitada con 0.7 volúmenes de Isopropanol, el tubo se agitó invirtiéndolo por diez ocasiones e incubándolo un mínimo 40 minutos; transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se eliminó y a la pastilla de ADN se le agregó 1 mL de etanol al 70%, se agitó el tubo invirtiéndolo diez ocasiones y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se eliminó y la pastilla de ADN fue secada en baño seco a 70°C. Una vez seca la pastilla de ADN fue reconstituida con 50  $\mu$ L de agua inyectable y se realizó la PCR como se describe en el punto 5.1.

#### **5.15. Análisis con el sistema Ab *Ehrlichia*® (Anigen®).**

El plasma obtenido a partir de las muestras sanguíneas fue procesado como lo indica el fabricante del estuche de inmunodetección de anticuerpos contra *Ehrlichia*, Ab *Ehrlichia*® de Anigen®. Los resultados de la PCR fueron comparados con el Estuche comercial.<sup>46</sup>

## 6. Resultados.

### 6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

El alineamiento *in silico* de los iniciadores se ilustra en la Figura 8. Se utilizó la herramienta BLAST-Primer del sitio NCBI, se aprecia el apareamiento de los iniciadores externos con un fragmento del gen 16sARN de diversas especies del genero *Ehrlichia*.

#### Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	23	70.50	65.22	7.00	5.00
Reverse primer	CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	21	66.52	66.67	6.00	2.00

#### Products on target templates

>[NZ\\_CP007479.1](#) Ehrlichia chaffeensis str. Wakulla, complete genome

```
product length = 479
Forward primer 1 AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC 23
Template 257644 ..... 257666
Reverse primer 1 CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 21
Template 258122 ..... 258102
```

>[NZ\\_CP007478.1](#) Ehrlichia chaffeensis str. Saint Vincent, complete genome

```
product length = 479
Forward primer 1 AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC 23
Template 257189 ..... 257211
Reverse primer 1 CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 21
Template 257667 ..... 257647
```

>[NZ\\_CP007476.1](#) Ehrlichia chaffeensis str. Liberty, complete genome

```
product length = 479
Forward primer 1 AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC 23
Template 258169 ..... 258191
Reverse primer 1 CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 21
Template 258647 ..... 258627
```

>[NZ\\_CP007475.1](#) Ehrlichia chaffeensis str. Jax, complete genome

**Figura 8.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores externos.

En la Figura 9. Se observa el alineamiento de los iniciadores únicamente en la región del gen de *E. canis*.

### Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	27	58.44	37.04	6.00	6.00
Reverse primer	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA	29	59.07	34.48	11.00	7.00

### Products on target templates

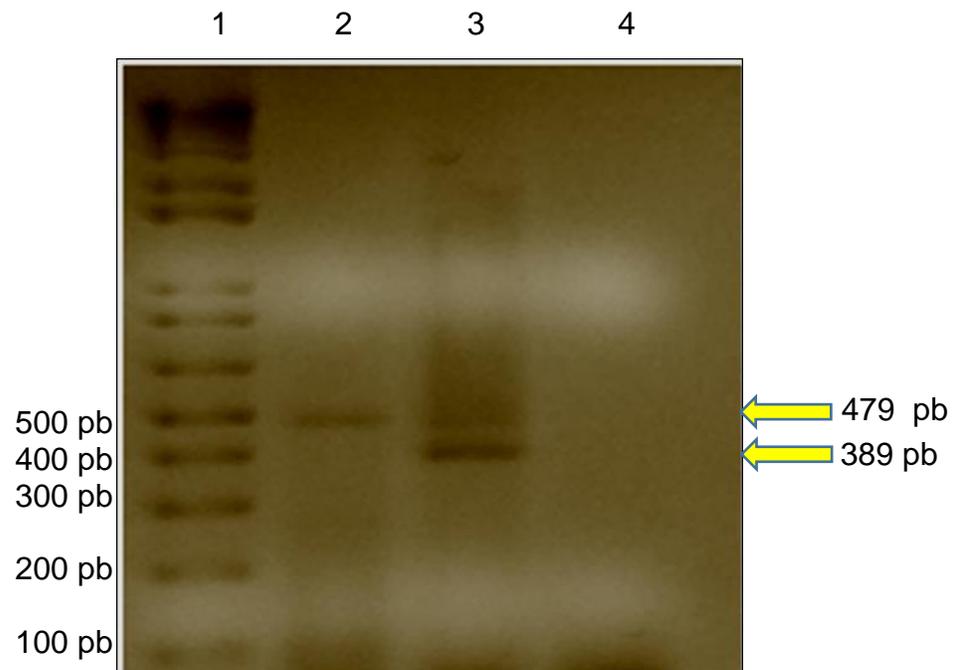
>[NC\\_007354.1](#) *Ehrlichia canis* str. Jake, complete genome

```
product length = 389
Forward primer 1      TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT 27
Template        286391 ..... 286365

Reverse primer 1      CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA 29
Template        286003 ..... 286031
```

**Figura 9.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores internos.

En la Figura 6. Se observa un gel de agarosa con los productos de la PCR externa y la PCR anidada con los pesos correspondientes. En el primer caso el producto tiene un tamaño de 479 pb y en la PCR anidada de 389 pb.

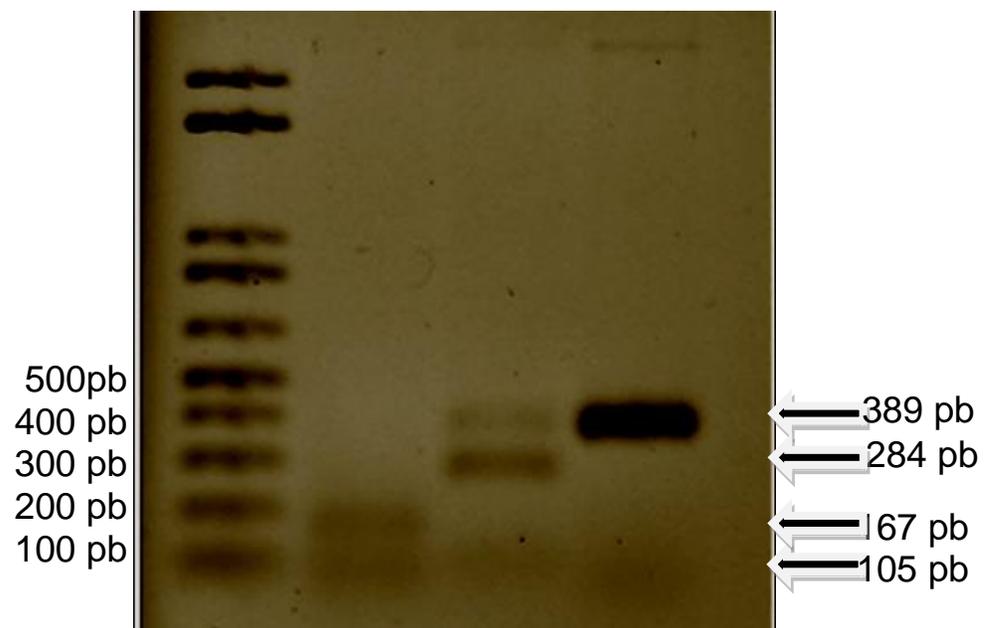
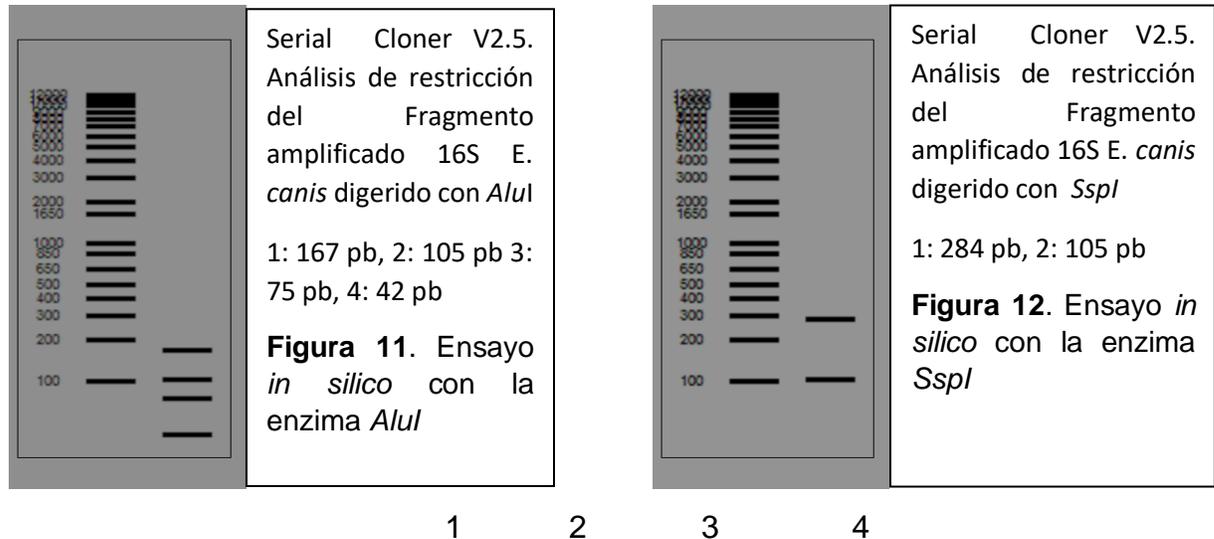


**Figura 10.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE con los productos de la PCR y PCR anidada. 1.-MPM 1kb plus, 2.-Producto de la PCR *Ehrlichia* spp. 3.-Producto de la PCR anidada con los iniciadores para detectar *Ehrlichia canis*, 4.- Control Negativo

El primer fragmento se obtuvo con los iniciadores externos mencionados en material y métodos, el segundo se obtuvo a partir de la reacción anidada con los iniciadores internos, con el fragmento de la primera reacción como ADN blanco. El primer fragmento identifica al género *Ehrlichia* spp. y el segundo fragmento a la especie *E.canis*.

## 6.2. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar el fragmento amplificado.

En las Figuras 11 y 12 se muestran los ensayos *in silico* de las predicciones de los perfiles de restricción del fragmento interno de la PCR digerido con las enzimas *AluI* y *SspI*.

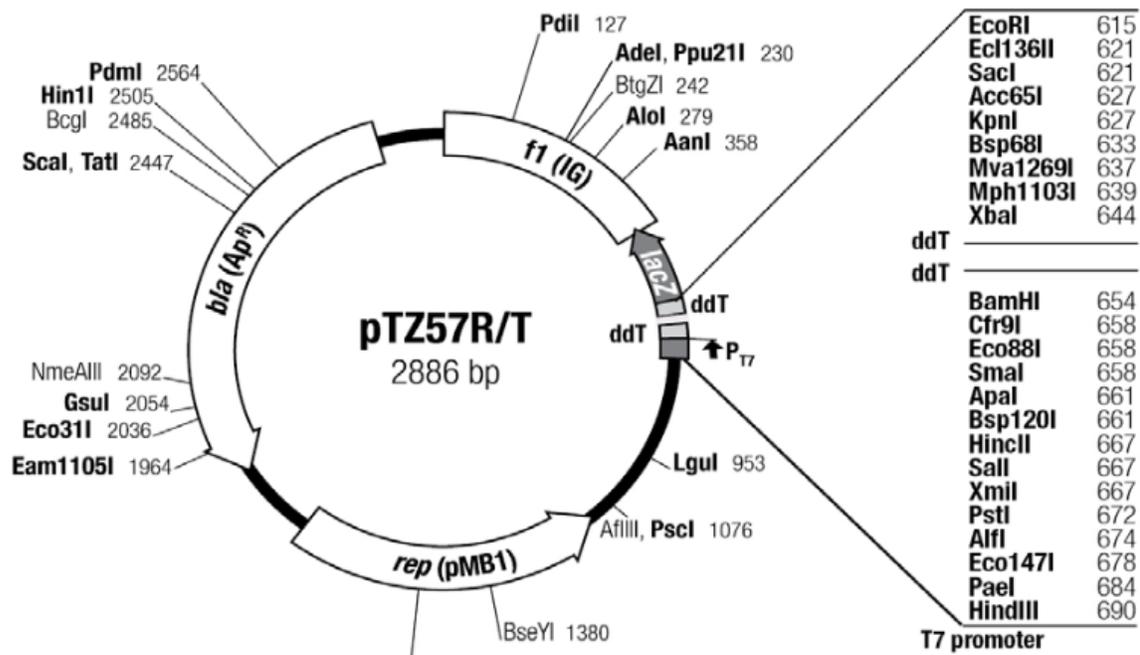


**Figura 13.** Fotografía de un gel de agarosa al 2% en TAE. 1.-MPM 1kb plus, 2.-Producto de la digestión de los productos de la PCR anidada con *AluI*, 3.- Producto de la digestión de los productos de la PCR anidada con *SspI*, 4.- Producto de la PCR anidada sin digerir

En la Figura 13. Se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 2 % en TAE con los productos de la digestión con *AluI* que arroja fragmentos de una longitud de 165 y 105, pb. Para el caso de los fragmentos de 75 y 42 pb que también resultan de esta digestión no es posible visualizarlos debido a la reducida concentración de los mismos. Se muestra también el resultado de la digestión con *SspI* que genera productos de 284 y 105 pb.

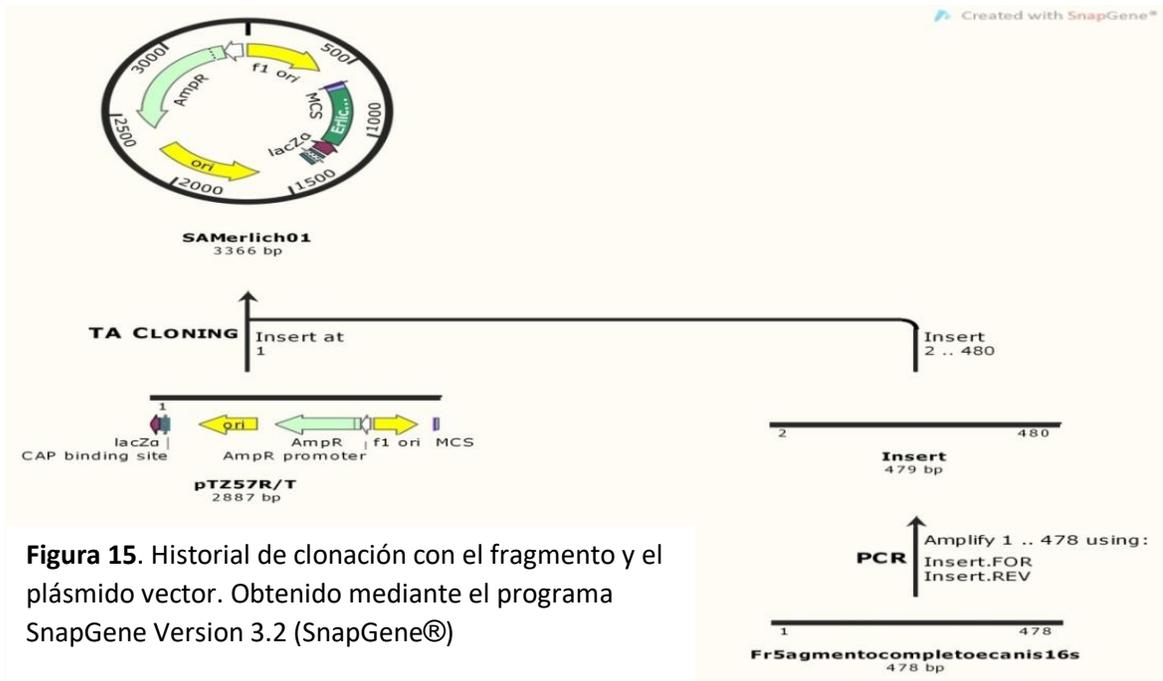
### 6.3. Sub-clonación.

Después de identificar con el ensayo de restricción el fragmento de la PCR este se sub-clonó en el plásmido pTZ57R/T (InstATclone PCR Cloning Kit ®) que se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Mapa del vector de clonación pTZ57R/T, con sus sitios únicos de restricción

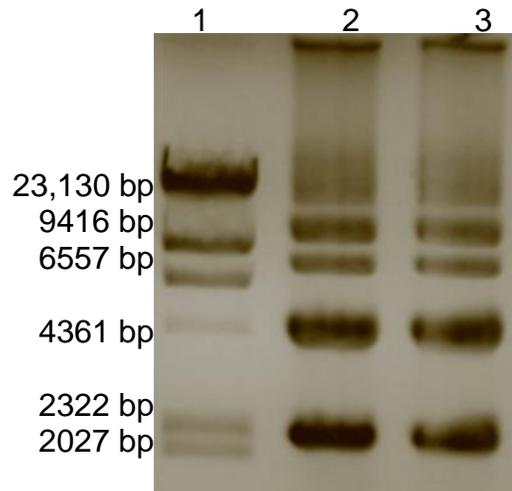
Con ayuda del programa SnapGene Version 3.2 se realizó una simulación de la inserción del fragmento al vector se aprecia en la Figura 15.



**Figura 15.** Historial de clonación con el fragmento y el plásmido vector. Obtenido mediante el programa SnapGene Version 3.2 (SnapGene®)

#### 6.4. Extracción de plásmido.

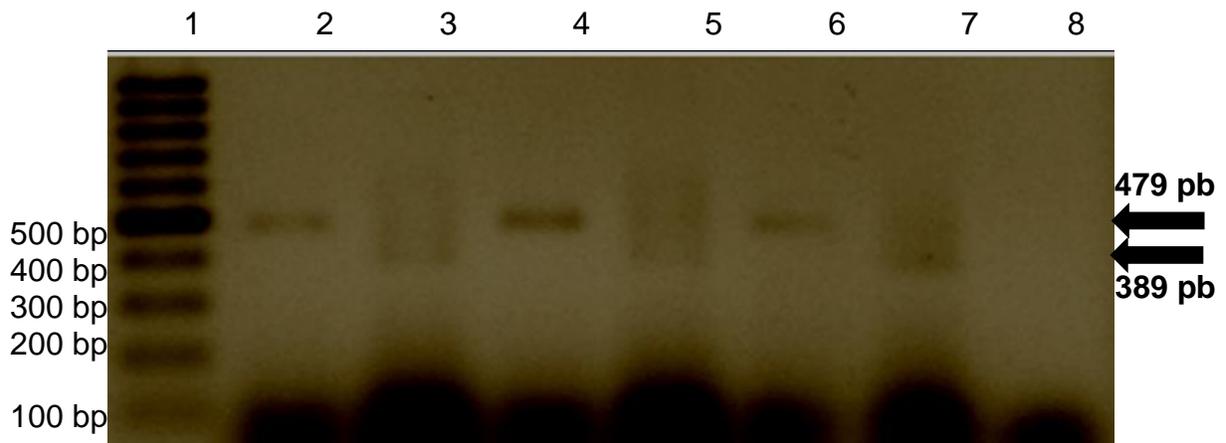
En la Figura 16. Se muestran los productos de la extracción de ADN plasmídico, a partir de la cepa de *E. coli* HB101 transformada con el plásmido pSIM1.0.



**Figura 16.** Fotografía de un gel de agarosa al 1 % en TAE con los productos de la extracción de plásmido. 1.- MPM DNA/Lambda HindIII Marker 2 Fermentas® 2 y 3.-Plásmido de la clona pSIM 1.0

### 6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *16sARN*

Al plásmido pSIM1.0 resultante de la clonación, se le realizó la PCR. Los resultados se aprecian en la Figura 17, donde se observa los productos de amplificación en ambas reacciones; tanto en la PCR externa como en la PCR anidada, con lo cual se comprobó que el plásmido contiene el inserto deseado.

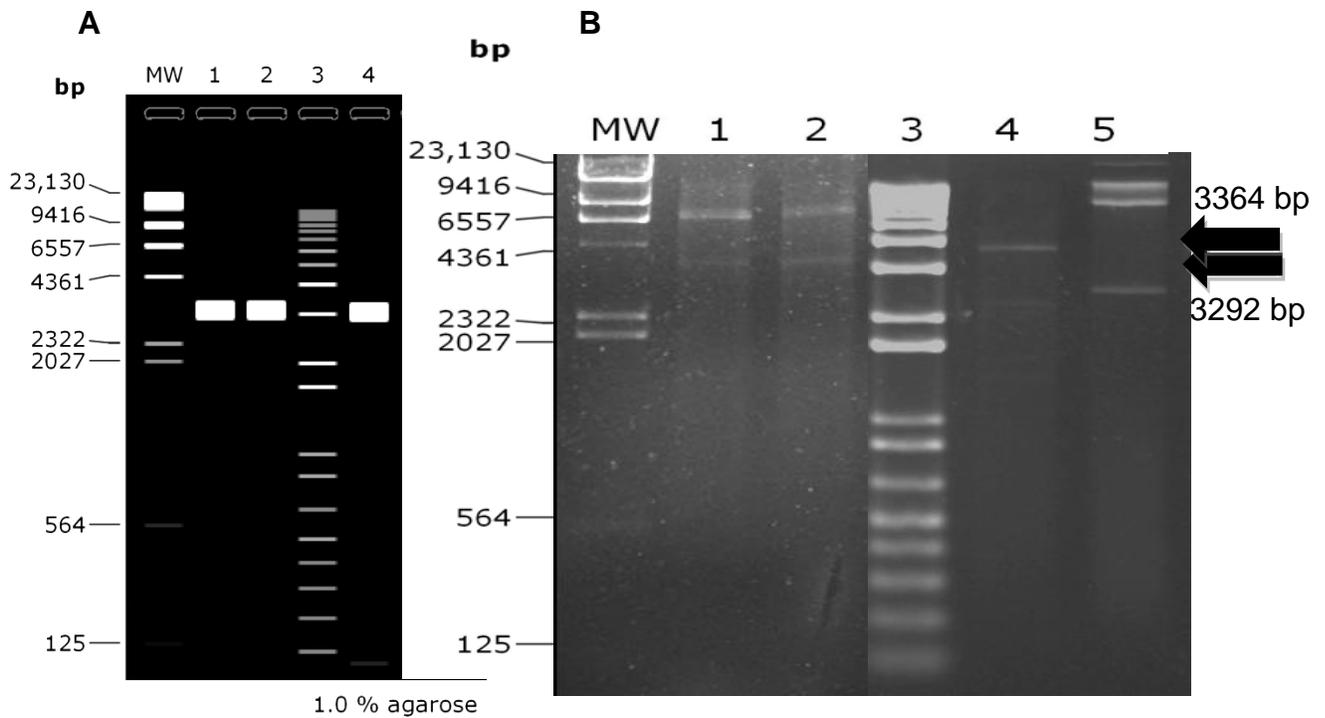


**Figura 17.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE con los productos de la PCR amplificados a partir del plásmido contenido en las clonas de *E. coli* HB1011.- MPM100 bp DNA Ladder Fermentas®, 2 y 4.-Productos de la PCR de la clona pSIM 1.0, 3 y 5.- Productos de la PCR anidada a partir de la PCR de los productos 2 y 4, 6.- C+, 7.-C+ anidado.-8.-C-.

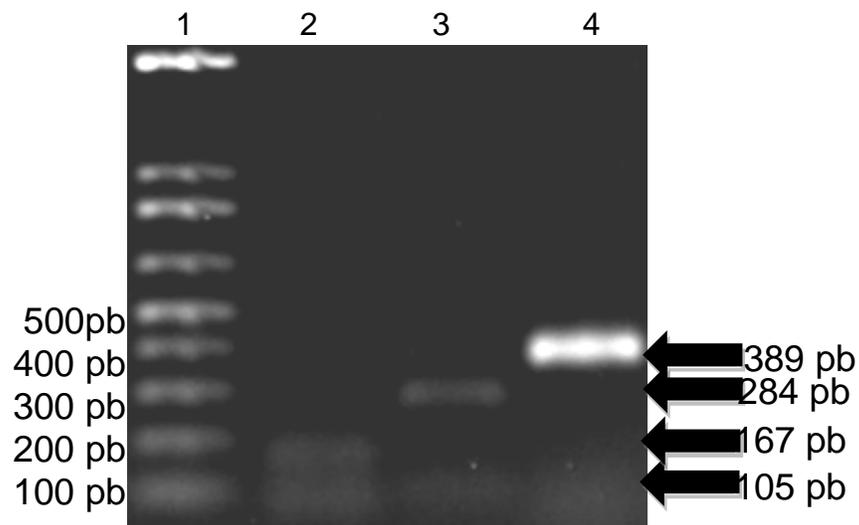
## **6.6. Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la construcción.**

Una vez efectuada la PCR se realizó la digestión del plásmido pSIM1.0 efectuado previamente un ensayo *in silico* y obteniendo los perfiles de restricción que se aprecian en la Figura 18 A. se utilizó el protocolo de digestión indicado por el fabricante de las enzimas *Sall*, *Xbal* y *KpnI*. En la Figura 18 B. Se observan los perfiles obtenidos de las simulaciones efectuadas. El perfil de digestión obtenido indica que el plásmido contiene el fragmento deseado en dirección invertida, como se observa en la Figura 20. Sin embargo, debido a que pSIM1.0 será utilizado como control positivo, la posición del fragmento no afecta los estudios que se efectuaron.

En el caso de la digestión con *KpnI*, el fragmento de 72 pb no se aprecia posiblemente por la poca cantidad obtenida en la digestión.

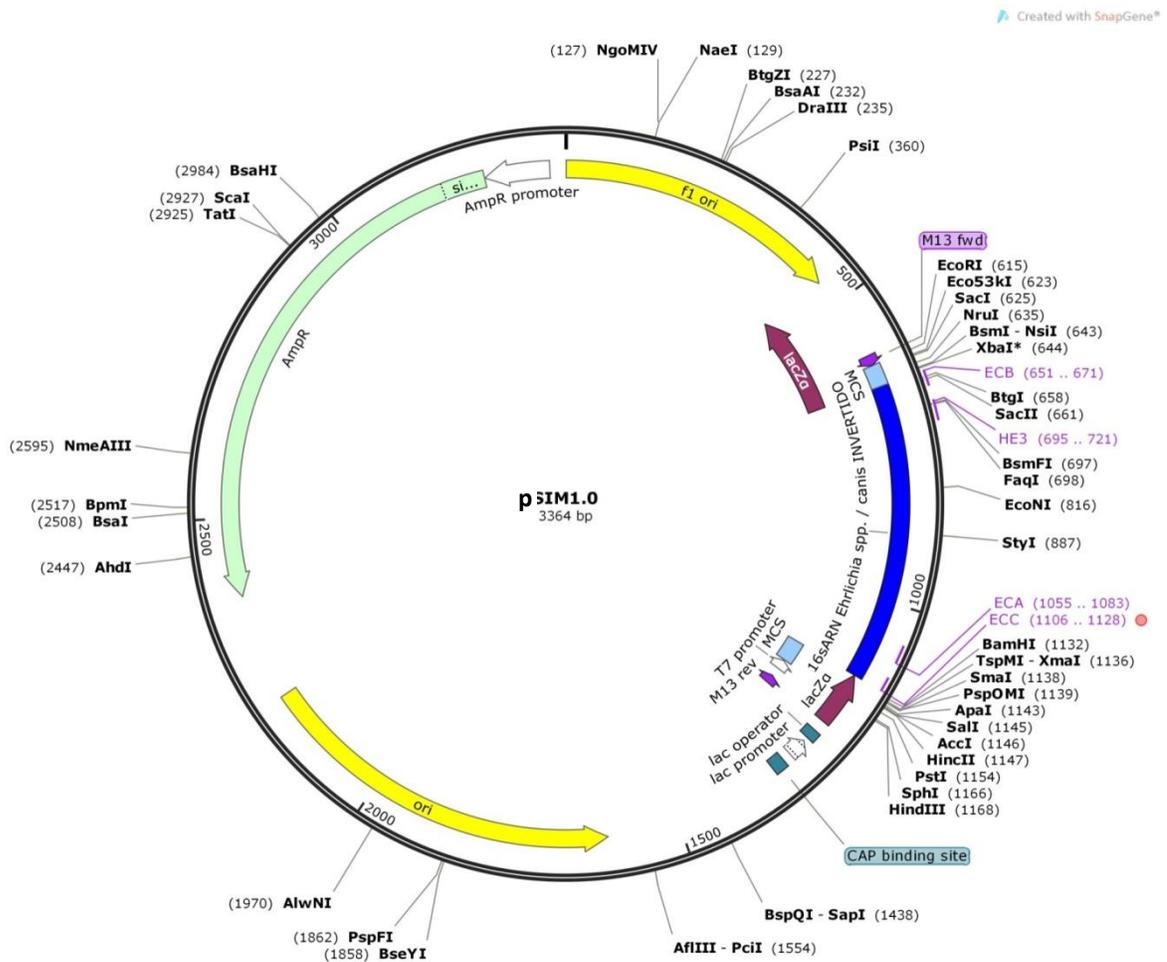


**Figura 18.** A) Ensayo *in silico* de la digestión de pSIM 1.0. B) Fotografía de gel de agarosa al 2% en TAE con los productos de la digestión con las enzimas *Sall*, *XbaI* y *KpnI*. MW: DNA – *Lambda HindIII*, 1: pSIM 1,0 cortado con *Sall*, 2: SIM 1,0 cortado con *XbaI*, 3: 1 Kb Plus DNA Ladder, 4: SIM 1,0 cortado con *KpnI*, 5: pSIM 1,0 Sin digerir. Simulación generada por el software SnapGene®.



**Figura 19.** Fotografía de un gel de agarosa al 2% en TAE. Se observa que la digestión realizada con las enzimas es similar al ensayo *in silico* que se muestra en las Figuras 7. Y 8. Carriles: 1.-MPM 1kb plus, 2.-Producto de la digestión de los productos de la PCR anidada con *AluI*, 3.- Producto de la digestión de los productos de la PCR anidada con *SspI*, 4.- Producto de la PCR anidada sin digerir

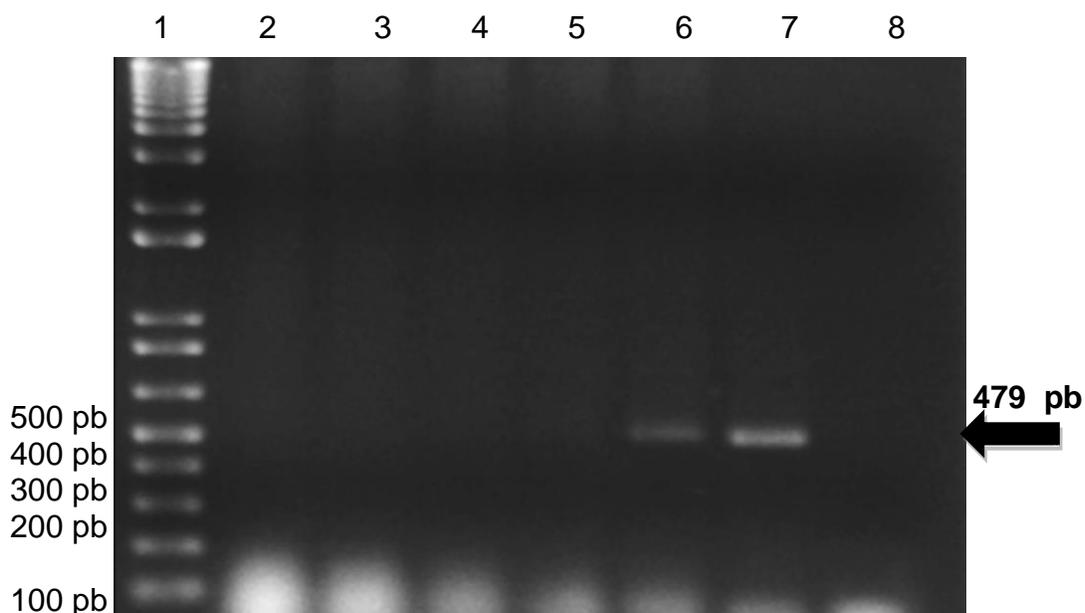
El fragmento obtenido mediante PCR anidada se digirió con las enzimas *AluI* y *SspI* obteniendo los fragmentos esperados, en el ensayo *in silico* que se muestra las Figuras 11 y 12. Al separarlos en el gel y visualizarlos se observa el patrón esperado (Figura 19).



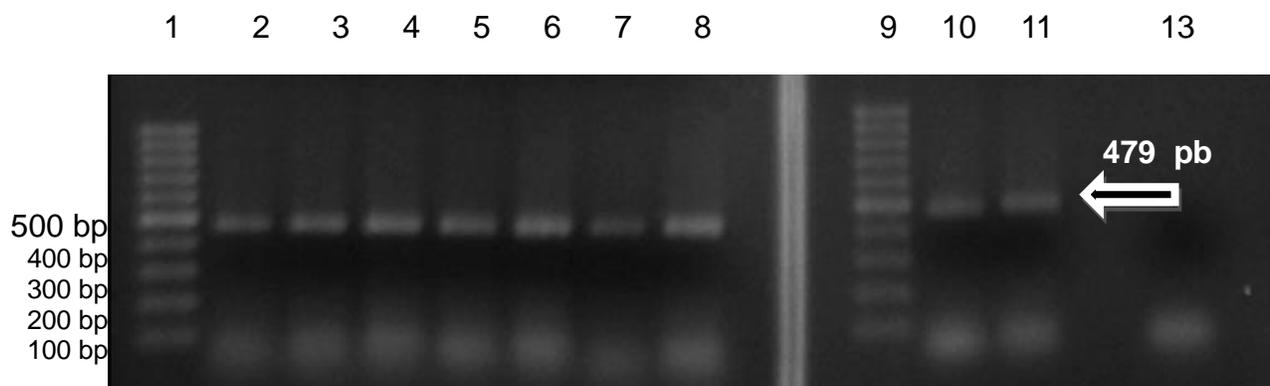
**Figura 20.** Mapa del vector con el inserto deseado de *Ehrlichia spp./E.canis*, el fragmento se encuentra en posición invertida dentro del plásmido. Al plásmido se le denominó pSIM1.0. Obtenido con la herramienta SnapGene Version 3.2.

## 6.7. Ensayos de concentración mínima detectable y saturación de la reacción PCR.

Comprobada la identidad de pSIM1.0, este se utilizó para ensayos de saturación de la reacción. Como se puede apreciar en la Figuras 21 y 22, a una concentración de 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del ADN plasmídico el fragmento no se amplificó. No obstante, a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  se puede observar un amplificado.

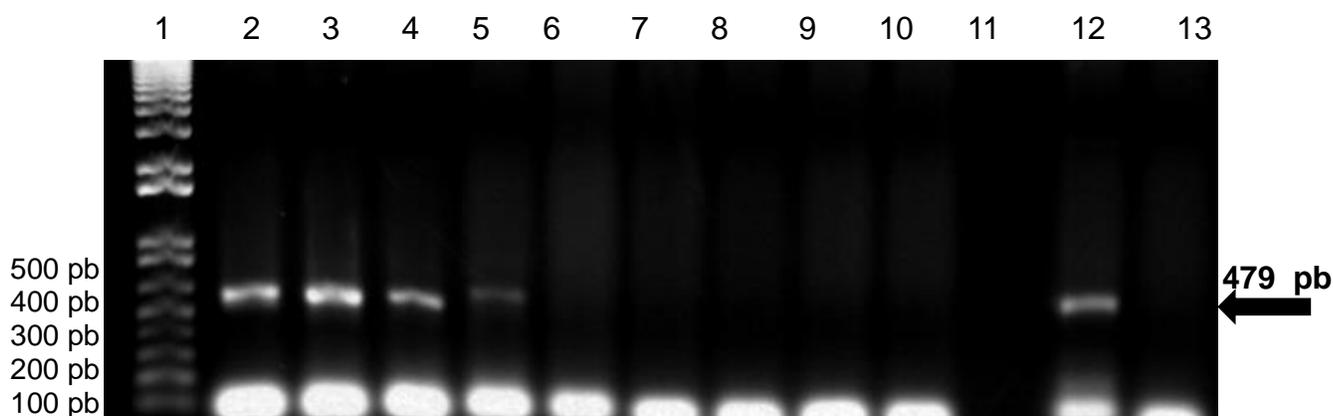


**Figura 21.** Fotografía de un gel de agarosa con los productos de la PCR obtenidos con diferentes concentraciones del pSIM1.0. 1.-MPM 1kb plus, 2-6.-Productos de la PCR. En las siguientes concentraciones: 64 $\mu\text{g}$ , 32  $\mu\text{g}$ , 16  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 7.-Control Positivo, 8.- Control Negativo.



**Figura 22.** Fotografía de un gel de agarosa con los productos de la PCR obtenidos con diferentes diluciones del pSIM1.0. 1y 9.-MPM 100 pb, 2-8, 10 y 11.-Productos de la PCR. En las siguientes concentraciones: 4  $\mu\text{g}$ , 3.5  $\mu\text{g}$ , 3  $\mu\text{g}$ , 2.5  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1.5  $\mu\text{g}$ , 1 $\mu\text{g}$  500 ng y 200 ng 13.- Control Negativo.

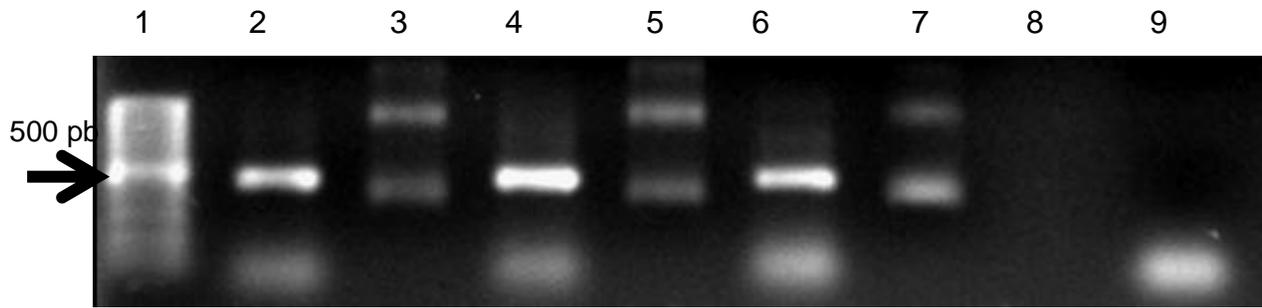
En la Figura 23, se observa la imagen de un gel con los productos de la PCR con distintas concentraciones del pSIM1.0. Se aprecia que después de la concentración de **500 pg/μL** ya no es detectable por este método.



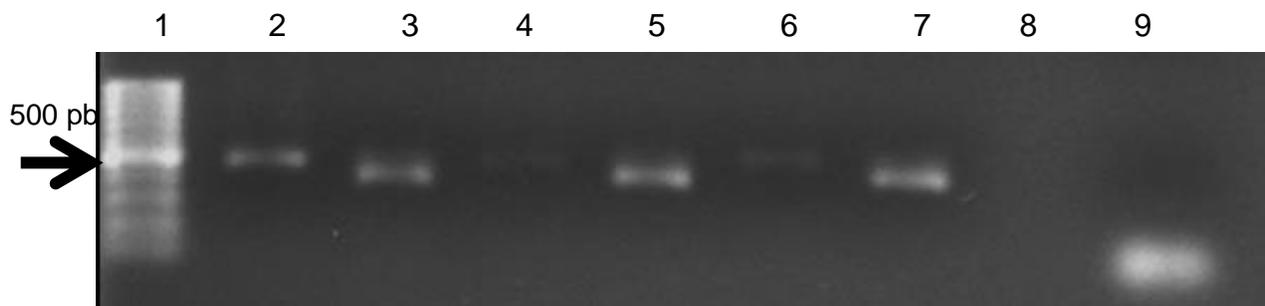
**Figura 23.** Fotografía de un gel de agarosa con los productos de la PCR obtenidos con diferentes diluciones del pSIM1.0. 1.-MPM 1kb plus, 2-10.-Productos de la PCR. En las siguientes concentraciones: 100 ng, 50 ng, 5 ng, **500 pg**, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg y 5 fg 12.-Control Positivo, 13.- Control Negativo.

### 6.8. Estandarización de la PCR anidada.

Los productos de la PCR anidada a partir del control positivo, presentaron bandas inespecíficas y barrido. Para su eliminación se realizaron los procedimientos descritos en material y métodos del punto 5.11. En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos con la dilución de los productos de la PCR a una concentración de 100 ng donde es posible apreciar la ausencia de barrido o el bandeo inespecífico. En la Figura 25. Pueden observarse los productos de PCR empleando el fragmento externo purificado apreciando únicamente el fragmento esperado sin bandas inespecíficas.



**Figura 24.** Fotografía de un gel de agarosa con los productos de la PCR anidada obtenidos mediante la dilución del fragmento externo a una concentración de 100ng/μL . 1.- MPM 100pb 2,4.-pSIM1.0 con los iniciadores externos, 6.-C+. 3,5.- amplicon de la SIM 1.0 con los iniciadores internos, 7.-C+. 9.- C-



**Figura 25.** Fotografía de un gel de agarosa con los productos de la CR anidada obtenidos mediante la purificación con solventes del fragmento externo. 1.- MPM 100pb 2,4.-SIM1.0, 6.-C+. Productos de la PCR con iniciadores externos 3,5.- pSIM1.0, 7.-C+. 9.- C- Productos de la PCR anidada a partir del primer amplicon purificado con fenol y acetato de sodio.

Este resultado permite inferir que la presencia de bandas inespecíficas y barrido en la anterior PCR se debe los remanentes de iniciadores externos que se incluían en la reacción anidada y posiblemente se alineaban generando fragmentos de diferentes pesos. No obstante esto no es un inconveniente para llevar a cabo la prueba con muestras clínicas.

### **6.9. Procesamiento de las muestras sanguíneas.**

En la Cuadro 4 se encuentran registrados los datos de las muestras sanguíneas obtenidas, todas ellas son positivas en las reacciones serológicas realizadas por los médicos veterinarios, la mayoría de ellas se probaron con el sistema de IDEXX®, a excepción de un control negativo indicado con asterisco (\*).

<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Género</b>	<b>Raza</b>	<b>Zona geográfica</b>
I	2 años	Macho	Dogo de Burdeos	CDMX
II	9 años	Macho	SD	Veracruz
III	10 años	Hembra	Poodle	Veracruz
IV	5 años	Macho	Schnauzer	Veracruz
V	6 años	Macho	Poodle	Veracruz
VI	4 años	Hembra	Crestado Chino	Veracruz
VII	5 años	Macho	Labrador	Veracruz
VIII	11 años	Macho	Labrador	Veracruz
IX	6 años	Macho	Chuahueño	Veracruz
X	9 años	Macho	Chihuahueño	Veracruz
XI	3 años	Macho	Gran Danés	CDMX
XII	3 años	Hembra	Gran Danés	CDMX
XIII	SD	SD	SD	Colima
XIV	SD	Hembra	SD	Colima
XV	SD	Macho	SD	Colima
XVI	SD	SD	SD	Colima
XVII	SD	Hembra	SD	Colima
XVIII	SD	SD	SD	Colima
XIX	SD	Macho	SD	Colima
XX	SD	SD	SD	Colima
XXI	SD	SD	SD	Colima
XXII	SD	SD	SD	Colima
XXIII	SD	Hembra	SD	Colima
XXIV	SD	SD	SD	Colima
XXV	SD	Macho	SD	Colima
XXVI	SD	Hembra	SD	Colima
XXVII	SD	SD	SD	CDMX
XXVIII	SD	SD	SD	CDMX
XXIX	SD	SD	SD	CDMX
XXX	SD	SD	SD	CDMX
XXXI	SD	SD	SD	CDMX
XXXII*	7 años	Macho	Mestizo	Edo. Mex.
XXXIII*	11 años	Macho	Mestizo	Edo. Mex.
XXXIV*	11 años	Hembra	Mestizo	Edo. Mex.
XXXV*	7 años	Hembra	Mestizo	Edo. Mex.
XXXVI*	2 años	Hembra	Dash Hound	Edo. Mex.
XXXVII*	14 años	Macho	Pit Bull	Edo. Mex.
XXXVIII*	15 año	Hembra	Doberman	Edo. Mex.
XXXIX*	1 años	Hembra	Pastor Australiano	Edo. Mex.

XL*	2 años	Hembra	Pastor Australiano	Edo. Mex.
XLI*	10 años	Hembra	Mestizo	Edo. Mex.
XLII	5 años	Hembra	Terrier escoces	Edo. Mex.
XLIII	14 años	Macho	Mestizo	Edo. Mex.
XLIV	SD	Macho	Cobrador Dorado	CDMX
XLV	3 meses 1 año 6 meses	Hembra	Boxer	Edo. Mex.
XLVI		Macho	Cobrador Dorado	CDMX
XLVII	7 años	Macho	Labrador	CDMX
XLVIII	8 años	Hembra	Schnauzer	Edo. Mex.
XLIX	4 años	Hembra	Poodle	Edo. Mex.
L	SD	Hembra	SD	CDMX
			Gigante de los Pirineos	
LI	9 años	Macho		Edo. Mex.
LII	16 años	Hembra	Schnauzer	CDMX
LIII	12 años	Hembra	Schnauzer	CDMX
LIV	10 años	Macho	Viejo Pastor Ingles	CDMX
LV	SD	SD	SD	CDMX
LVI	3 años	Hembra	Yorkshire terrier	CDMX
LVII	SD	Macho	SD	Colima
LVIII	SD	SD	SD	Colima
LIX	SD	SD	SD	Colima
LX	SD	SD	SD	Colima
LXI	SD	SD	SD	Colima
LXII	SD	SD	SD	CDMX
LXIII	SD	Macho	SD	CDMX

**Cuadro 4. Datos de las muestras de sangre utilizadas en el estudio.** Provenientes de pacientes clínicamente diagnosticados como positivos en la serología realizada por los clínicos.

\*Control negativo. SD: Sin Dato, ID: Identificación

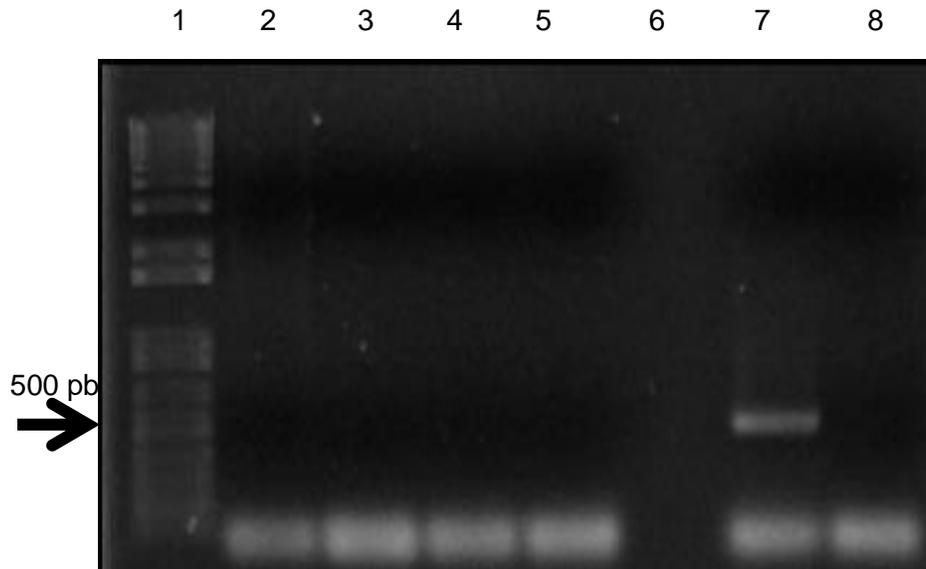
Al ADN obtenido a partir de estas muestras, se le efectuó la PCR y la PCR anidada, como se muestran en las imágenes de los geles de las Figuras 26-35. En las muestras que aparecen en las Figuras 26-31 no hubo detección del fragmento en la PCR externa, mientras que en la PCR anidada el fragmento fue detectado. Caso contrario de las Figuras 32-35 donde las muestras fueron positivas en la PCR externa y negativas en la anidada.

Los resultados de la PCR aplicada a las muestras se enlistan en la Cuadro 6 donde se observan 15 positivos a *Ehrlichia canis* y 5 positivos a *Ehrlichia* spp. En total 29 muestras fueron positivas en serología con el estuche Ab de *Ehrlichia*®.

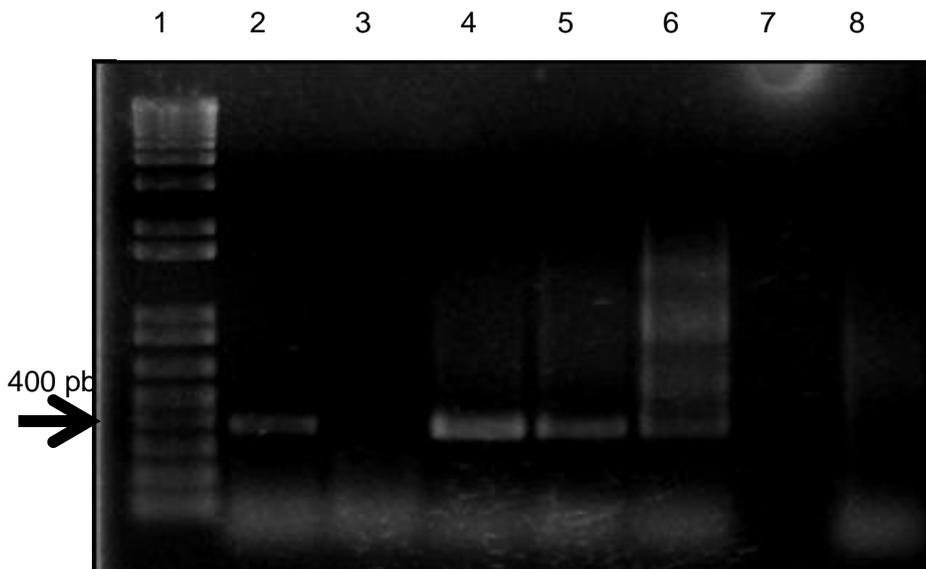
De las muestras que resultaron positivas en ambas pruebas se les interpretó como positivas, aquellas en donde se amplificó ADN de *Ehrlichia* y que fueron negativas en el panel serológico de Anigen® se les considera positivas. Las muestras que fueron negativas a la PCR y positivas en la serología se les denominó “sospechosas”, esto basándose en la presencia de anticuerpos contra el organismo, sin embargo no se detectó ADN de la bacteria.<sup>30</sup>

Las muestras cuyo resultado fue negativo en ambas pruebas se les interpretaron como negativas, se incluyen diez muestras que fueron el control negativo. (Cuadro 6.) Aparecen los resultados de dichas muestras y sus respectivos porcentajes.

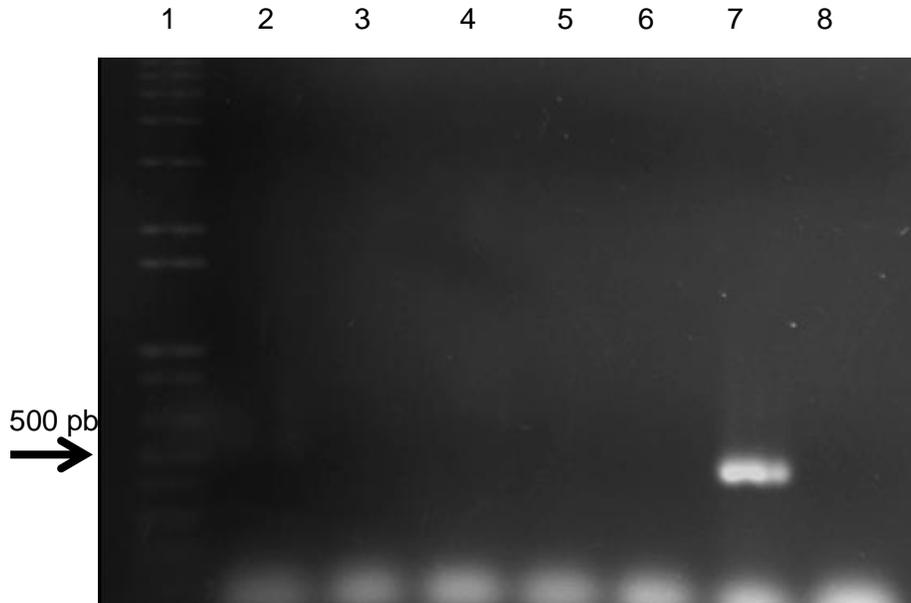
En la Cuadro 7 se presentan los resultados positivos en la PCR anidada en donde se aprecia cuantos corresponden a *Ehrlichia* spp o a *Ehrlichia canis*.



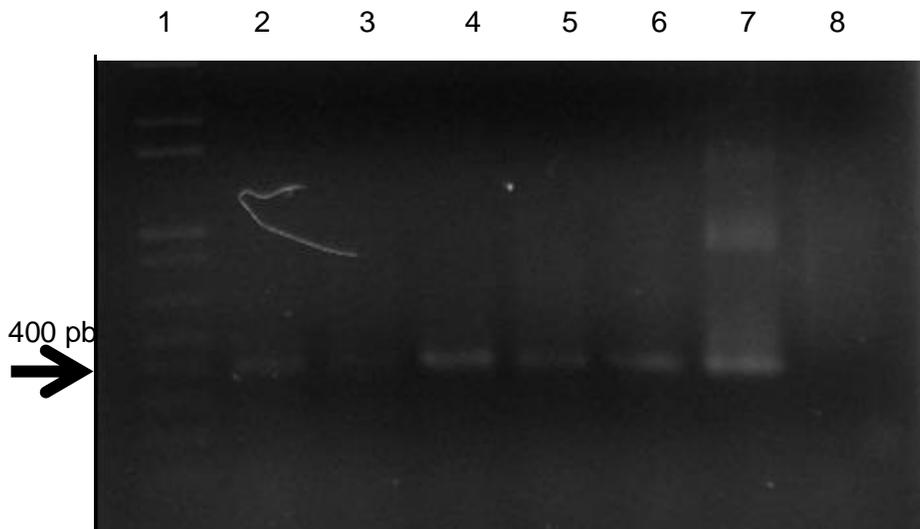
**Figura 26.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 479 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2-5 no hay detección del amplificado, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. 1.- MPM 1 kb plus 2-5.-Muestras I-IV, .7.-C+ SIM1.0, 8.- C-.



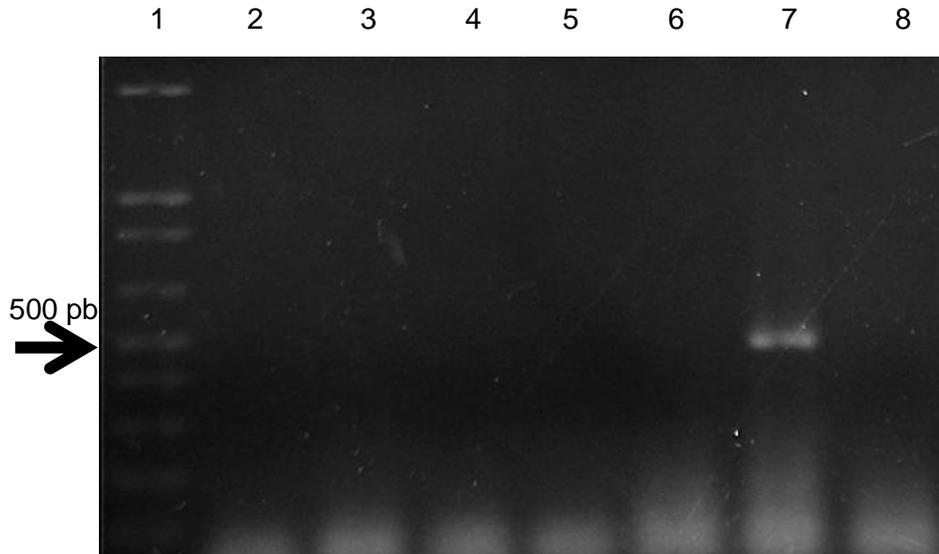
**Figura 27.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 6 se observa un amplificado de 389 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2 ,4 y 5 se observa un amplificado, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado, carril 3 no hay detección del amplificado. Este resultado se obtuvo después de realizar el anidamiento con los iniciadores ECA y HE-3. Carriles: 1- MPM 1 kb plus 2-5.- Muestras I-IV. 6.-C+ SIM1.0, 8.- C-.



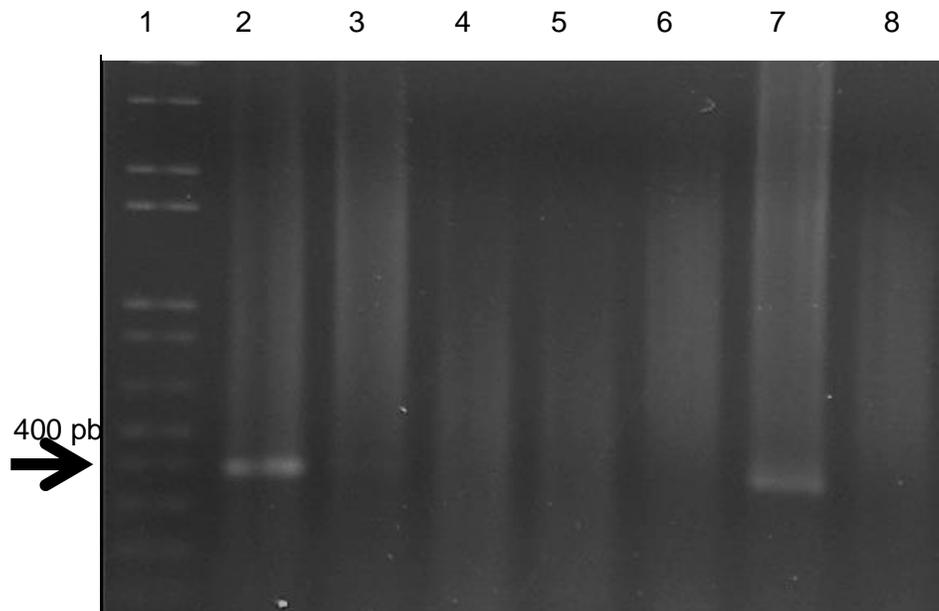
**Figura 28.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 479 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2-6 no se detectó amplificado, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-6.-Muestras V-IX 7.-C+ 8.-C-.



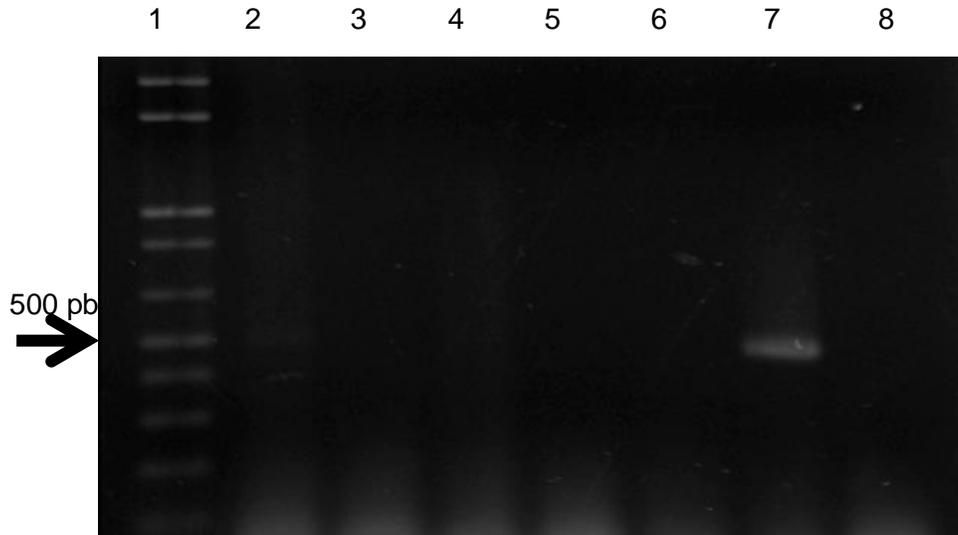
**Figura 29.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 389 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2-6 se observa un amplificado, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Esto es después de llevar a cabo el anidamiento con los iniciadores internos. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-6.-Muestras V-IX 7.-C+ 8.-C-.



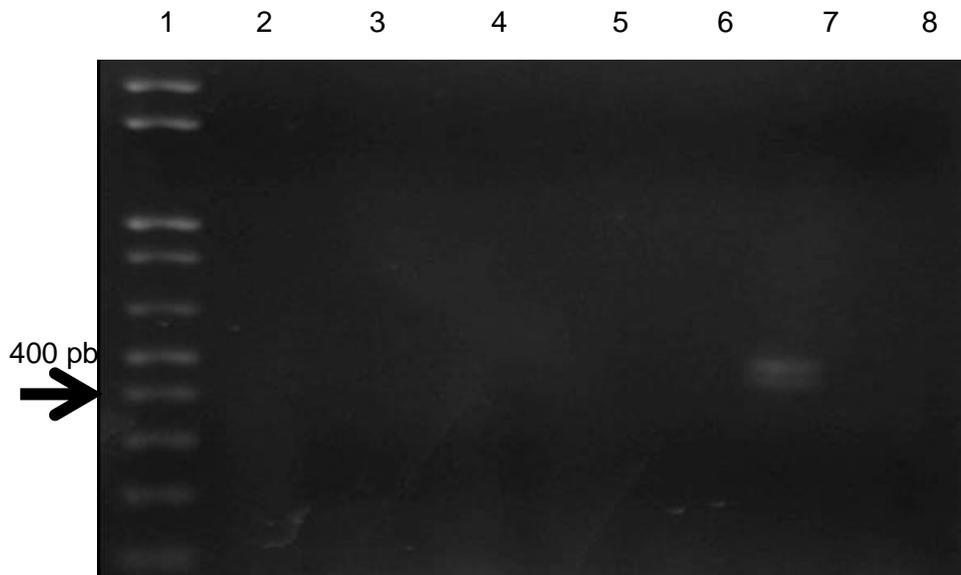
**Figura 30.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 479 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2-6 no se detectó el amplificado, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus, 2-6.- Muestras XXI-XXV 7.-C+ 8.-C-. Se observa que a partir de todas las muestras y el control negativo no hay amplificado, contrario del control positivo donde se observa un fragmento de 479 pb.



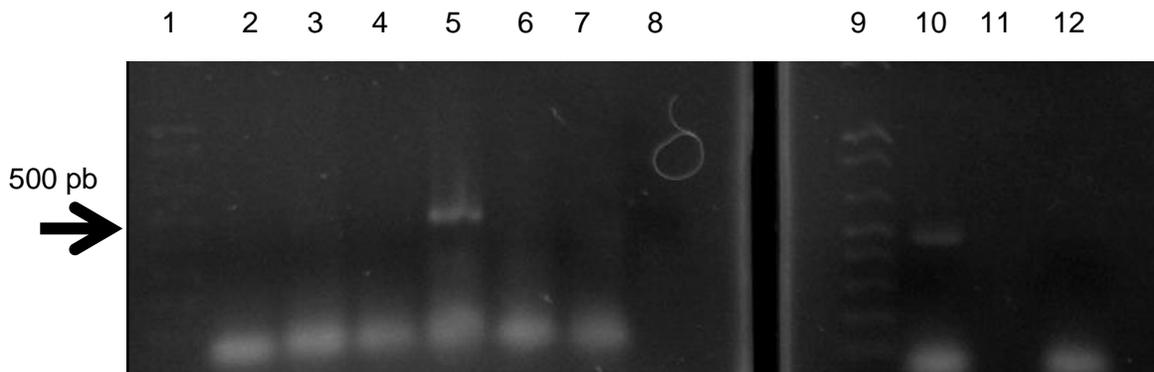
**Figura 31.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 389 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2 y 3 se observa un amplificado del mismo tamaño, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Este resultado se obtuvo después de realizar el anidamiento con los iniciadores ECA y HE-3. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-6.-Muestras XXI-XXV 7.-C+ 8.-C-



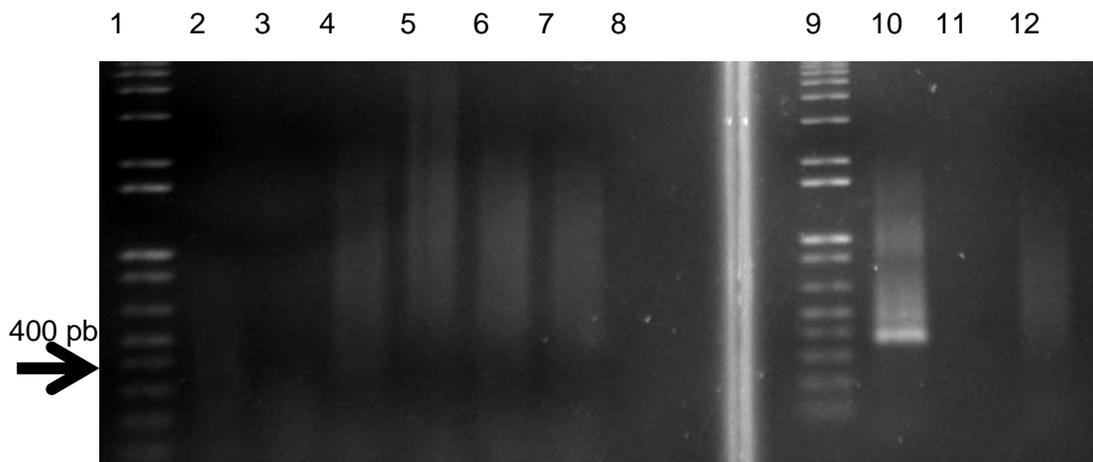
**Figura 32.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 479 pb que corresponde al control positivo, en el carril 2 se observa un amplificado del mismo tamaño que el del control positivo las muestras en los carriles 3-6 no hubo detección del fragmento, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-6.-Muestras XLVII-LI 7.-C+ 8.-C-



**Figura 33.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 7 se observa un amplificado de 389 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2-6 no se detectó la secuencia, en el carril 8 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-6.-Muestras XLVII-LI 7.-C+ 8.-C-



**Figura 34.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 10 se observa un amplificado de 479 pb que corresponde al control positivo, en el carril 5 se observa un amplificado del mismo tamaño que el del control positivo las muestras en los carriles 3-4 y 6-7 no hubo detección del fragmento, en el carril correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-7.-Muestras LVI-LXI 9.- MPM 1 kb plus 10.-C+ 12.-C-



**Figura 35.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE. En el carril 10 se observa un amplificado de 389 pb que corresponde al control positivo, las muestras en los carriles 2-7 no se detectó la secuencia, en el carril 12 correspondiente al control negativo no hay presencia de amplificado. Carriles: 1.- MPM 1 kb plus 2-7.-Muestras LVI-LXI 9.- MPM 1 kb plus 10.-C+ 12.-C-



**Figura 36.** Panel de la prueba serológica de Anigen A) Panel con una muestra positiva B) Panel con muestra Negativa. En el caso de la prueba positiva se observa que por efecto de la reacción antígeno anticuerpo, se efectúa una reacción colorimétrica donde se aprecia en el panel en la sección (T) una línea de color morado. En el caso de la prueba negativa al no haber la reacción antigénica no hay cambio de coloración en la sección (T).

ID	Serología	PCR/PCR anidada	ID	Serología	PCR/PCR anidada
I	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
II	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.	XXXIII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
III	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXIV	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
IV	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXV	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
V	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXVI	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
VI	Negativo	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXVII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
VII	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXVIII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
VIII	Negativo	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XXXIX	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
IX	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XL	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
X	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XLI	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XI	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.	XLII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XII	Negativo	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XLIII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XIII	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	XLIV	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XIV	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	XLVII	Negativo	<b>Positivo a Ehrlichia spp.</b>
XV	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	XLVIII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XVI	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.	XLIX	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XVII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.	L	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XVIII	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LI	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.
XIX	Negativo	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	LII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XX	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LIII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XXI	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	LIV	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XXII	Negativo	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>	LV	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.
XXIII	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LVI	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.
XXIV	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.	LVII	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia spp.</b>
XXV	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LVIII	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia spp.</b>
XXVI	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LIX	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia canis</b>
XXVII	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia spp.</b>	LX	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XXVIII	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LXI	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.
XXIX	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia spp.</b>	LXII	Negativo	Negativo a Ehrlichia spp.
XXX	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.	LXIII	<b>Positivo</b>	Negativo a Ehrlichia spp.
XXXI	<b>Positivo</b>	<b>Positivo a Ehrlichia spp.</b>			

**Cuadro 5. Resultados obtenidos de las muestras clínicas a partir de la PCR y Serología.** En color rojo se indica el resultado obtenido con el panel serológico, a la derecha se indican los resultados arrojados por la PCR. En gris se observan los números correspondientes a las muestras de pacientes sanos.

PCR anidada y el panel serológico Anigen®.	# de muestras	%	Interpretación
(+) ambas pruebas	14	22.2	Positivos
PCR(+)/ Panel(-)	7	11.1	Positivos
PCR(-)/Panel(+)	15	23.8	Sospechosos
(-) ambas pruebas	27	42.9	Negativos
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>100</b>	

**Cuadro 6. Resultados de las 63 muestras;** 14 fueron positivas en la PCR y en el panel serológico, 7 positivas en la PCR y negativas en la serología, 15 negativas en la PCR siendo positivas en la serología y 27 negativas en ambas pruebas. Así mismo, de estas 27 muestras 10 pertenecen al control negativo teniendo como porcentaje el 6.3% de toda la muestra.

<b>Positivos PCR</b>	<b>21</b>
<i>Ehrlichia</i> spp.	6
<i>Ehrlichia canis</i>	15

**Cuadro 7. Resultados positivos mediante la PCR a *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis*.**

## 7. Discusión

En este trabajo se sub-clonó y se transformó el fragmento del gen *16sARNr*, que se obtuvo de la PCR externa se utilizó como control positivo a *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis*. Luego con el plásmido pSIM1.0 obtenido fue transformada en una cepa de *E. coli* HB101 que crece en medios de cultivo convencionales. Este control fue usado para estandarizar una PCR anidada, de tal forma que las condiciones descritas en la literatura<sup>10</sup> se modificaron, haciendo más específica y sensible la prueba. Posterior a la estandarización de la PCR, el control recombinante obtenido fue usado en las pruebas de PCR posteriores aplicadas a las muestras clínicas, demostrando su utilidad en el diagnóstico, pues el resultado se hizo más certero y se redujeron los costos.

Una parte importante de los resultados es que en todas las muestras donde se amplificó el fragmento de *E. canis* en la reacción anidada no se detectó el fragmento con los iniciadores externos. Esto puede deberse a la fase de la enfermedad la que se encuentra en el paciente, ya que es primordialmente en el estadio agudo de la enfermedad, donde es posible encontrar monocitos en el torrente sanguíneo que contienen a la bacteria. Harrus *et al.* documentaron que en un paciente con estadio crónico de la enfermedad la bacteria tiene tropismo por el bazo y la médula ósea.<sup>30</sup> Por esta razón, una muestra de médula ósea sería lo idóneo, ya que el procedimiento para la biopsia de médula ósea, a pesar de ser complejo, es menos invasivo que la toma de biopsia a partir del bazo, que requiere un procedimiento quirúrgico .

De los resultados obtenidos a partir de las muestras que se procesaron en este trabajo, las identificadas con los números II y III, contaban con un diagnóstico clínico de estadio crónico sin confirmar, que fue determinado por un MVZ después de obtener un resultado serológico positivo a *Ehrlichia canis* con el panel comercial de IDEXX®. En el caso de la muestra III proveniente de una hembra, se indicó que seis meses previos a la toma de muestra presentaba un cuadro clínico de piómetra. Esto sugiere que al enfrentar una infección sistémica, se reclutan grandes cantidades de leucocitos, que podrían estar infectados por la bacteria. Es por ello que se puede detectar ADN de la bacteria en monocitos de sangre, aún después de este periodo. Esto puede producirse por un proceso de inflamación posterior a una intervención quirúrgica como la ovariectomía.<sup>47</sup>

También esto apoya la posibilidad de que se trate de un animal persistentemente infectado,<sup>48,49</sup> en los cuales se han documentado en una infección experimental cuando se realizan muestreos a diferentes tiempos, variaciones en la detección molecular del género *Ehrlichia* en las cuales al infectar con *Ehrlichia chaffeensis* un animal fue positivo al séptimo día post-infección, al día 21 el resultado obtenido fue negativo y posteriormente al día 27 el resultado de la prueba molecular de este animal fue positiva.<sup>48</sup>

Cuando se lleva a cabo la prueba serológica no es posible diferenciar una infección en su estadio agudo o crónico.<sup>10</sup>

Las muestras sanguíneas pueden poseer inhibidores de la reacción, como se ha documentado con la hemoglobina e IgG.<sup>50,51,52</sup> En este trabajo se probaron

diferentes protocolos de extracción de ADN de modo tal, que al procesar las muestras se redujeran los inhibidores al máximo. Si existiesen dichos inhibidores en la primera reacción no se llevaría a cabo la amplificación, pero al realizar el anidamiento con los iniciadores internos puede ocurrir un efecto de dilución que ayudaría a reducir los efectos de los inhibidores.<sup>50</sup> Se sugiere para futuras investigaciones el uso de optimizadores de la reacción, que disminuyan el efecto de los inhibidores como es el caso de la albumina, la gelatina o detergentes como el tritón o el tween.<sup>50</sup>

Se determinó que la amplificación con los iniciadores externos ya reportados<sup>10</sup> no fue totalmente eficiente porque en las muestras que fueron positivas a la PCR anidada, no se detectó el amplicon externo aún con cinco repeticiones de la prueba. Esto sugiere la necesidad del diseño y evaluación de iniciadores externos más sensibles y específicos. En este trabajo se utilizó este par de juegos de iniciadores porque se contó con un control positivo (**Material y métodos**), también porque permite un panorama más amplio de otras especies del género presentes en el país, las cuales podrían estar infectando animales de compañía.<sup>10</sup>

Para el caso de aquellas muestras que fueron positivas en ambas pruebas (serología y PCR anidada) y se clasificación como **positivas**, se detectó el ADN a partir de células sanguíneas, así como la presencia de anticuerpos en contra de *Ehrlichia* detectados por medio del panel serológico lo cual, indica que hay una respuesta humoral en contra de la bacteria. Esta situación es compatible con una infección que está cursando dentro del estadio agudo de la enfermedad.<sup>8, 30</sup>

En aquellas muestras donde se detectó ADN y no se detectaron anticuerpos en contra de *Ehrlichia* se les denominó también **positivas**, podrían tratarse de pacientes que están enfrentando una infección temprana en la cual aún no se ha montado una respuesta inmune sérica detectable, lo que apoya que la PCR es más sensible que la prueba serológica.<sup>8, 30</sup>

Para el caso de los que fueron positivos por serología y negativos por PCR se le denominó **sospechosos**. Se sabe que en la fase crónica de la enfermedad la detección anticuerpos en contra de la bacteria puede sugerir su presencia. Principalmente porque la bacteria tiene tropismo por el bazo y la médula ósea, por lo que podría no detectarse ADN a partir de sangre.<sup>30</sup>

Se ha documentado el uso de diferentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la Ehrlichiosis, de los cuales se desconoce su efectividad en el paciente,<sup>10</sup> pues el seguimiento se lleva a cabo con ayuda de pruebas serológicas que seguirán siendo positivas por un periodo indeterminado. La PCR al realizarse como prueba de monitoreo en un caso positivo en el que se haya tratado con quimioterapéuticos, es útil ya que al finalizar la terapia antimicrobiana y realizarse la prueba molecular, esta ofrece información confiable sobre si la terapia tuvo o no éxito, dependiendo de la muestra que se remita al laboratorio y del estadio en que se encuentre el paciente.<sup>10</sup>

Por lo tanto la prueba serológica podría funcionar como tamiz de diagnóstico junto con la historia clínica, las pruebas de patología clínica y la exploración física del paciente, que después sería confirmado con la prueba molecular.<sup>51</sup>

La razón del uso de una prueba serológica que detecta a *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocitophilum* y *Dilofilaria immitis*, radica en el modo de transmisión de estos microorganismos, ya que se lleva a cabo por medio de vectores. En el caso de las bacterias que son transmitidas por la mordedura de las garrapatas de los géneros *Rhipicephalus*, *Ixodides* y *Dermacentor*.<sup>54</sup> El parásito es transmitido por moscos de los generos *Culex* y *Aedes* vectores presentes en áreas de alta incidencia de estas infecciones.<sup>54</sup> Es importante remarcar la diferencia en los signos clínicos de cada una de estas enfermedades, ya que es posible su diferenciación por el MVZ de acuerdo a la signología, aunado al empleo de pruebas de patología clínica.

La importancia en una prueba molecular como primera opción del clínico para el diagnóstico de la Ehrlichiosis, radica en la necesidad de un diagnóstico diferencial con otras enfermedades como Distemper Canino en etapas tempranas, babesiosis y leptospirosis.<sup>55</sup> En el momento en el que el médico veterinario recibe a un paciente con los signos ya mencionados (Semiología), el diagnóstico definitivo de la enfermedad puede apoyarse con la historia clínica donde se refiera la presencia de vectores, el clima donde resida el paciente y los antecedentes de profilaxis que incluya inmunizaciones y desparasitaciones. Además las pruebas de laboratorio, que incluyan una prueba molecular para el diagnóstico de Distemper y *Leptospira*, un análisis parasitológico para la babesiosis, y la PCR anidada para la Ehrlichiosis, todas ellas confirmatorias y con un tiempo máximo de resultados de 4 días. No obstante se deben valorar los costos para establecer la presencia de la enfermedad.

El beneficio económico que representa un control positivo recombinante, recae en la simplicidad de mantener una bacteria con el ADN necesario para la amplificación, de secuencia específicas de un microorganismo y que esta pueda desarrollarse en medios de cultivo convencionales. Lo cual elimina la necesidad de mantener viable y activa una línea celular que las bacterias de este género necesitan para replicar, disminuyendo los costos del diagnóstico. Lo anterior implica que con el diagnóstico molecular, la diferencia entre utilizar un control positivo recombinante y mantener una línea celular infectada es de aproximadamente de 52.94%.(Anexo. 3 Costos, Cuadro A.1).

La oportunidad que tiene esta prueba en el mercado es amplia puesto que hay laboratorios que ofrecen la PCR a un precio de \$850.00 pesos al público, trabajando con un estuche comercial que ofrece la empresa IDEXX®.<sup>50</sup> En el caso de la PCR basada en un control positivo clonado y puede ofrecerse al público en general a un precio de \$500.00 pesos, con una ganancia de \$112.63 pesos (Anexo. 3 Costos, Cuadro A.1).

Lo anterior apoya el uso de la PCR que es una prueba confirmatoria, como primera opción ante la serología, además la PCR no solo detecta *Ehrlichia* spp también detecta al género *Anaplasma*.<sup>10</sup>

## **8. Conclusiones.**

- I. Se estandarizó en el laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, la Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada para la detección de *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis* con iniciadores previamente reportados.<sup>10</sup>
- II. Se estableció un control positivo clonado y mantenido en la cepa de *E. coli* HB101.
- III. Se procesaron muestras clínicas y se realizó la PCR anidada. Al mismo tiempo se confrontaron las muestras con una prueba serológica comercial para detección de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y se demostró que la PCR ofrece un diagnóstico de mayor confiabilidad que la prueba serológica.
- IV. Se amplificó ADN de *Ehrlichia* y de *E. canis* a partir de las muestras clínicas con lo que se confirmó la hipótesis del trabajo.
- V. Se obtuvo un 33.3% de muestras positivas a partir del total de las procesadas.

## **9. Prospectiva.**

- A. Emplear optimizadores de la reacción que reduzcan al máximo los efectos de posibles inhibidores presentes en la muestra.
- B. Desarrollar un control interno para la PCR que pueda descartar el efecto de inhibidores sobre la PCR.

## 10. Referencias bibliográficas.

1. Rikihisa, Y. (2006). New findings on members of the family *Anaplasmataceae* of veterinary importance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 438–445. <http://doi.org/10.1196/annals.1374.083>
2. Groves, M. G., G. L. Dennis, H. L. Amyx, & D. L. Huxsoll. (1975) Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*. 36 (7):937–940.
3. Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R., Ristic, M., Cox, McDade D., (1987) Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic Rickettsia. *The New England Journal of Medicine*; 316(14): 853-856. DOI: 10.1056/NEJM198704023161406
4. Silva, A, Canseco, S. P., de la Torre, M. del P. G., Silva, A. M., Mayoral, Pérez-Campos, E. (2014). Infección humana asintomática por contacto con perros. un caso de ehrlichiosis humana. *Gaceta Médica de Mexico*, 150(2), 171–174.
5. Gongora-Biachi, R. A., Zavala-Velazquez, J., Castro-Sansores, C. J., & Gonzalez- Martinez, P. (1999). First case of human Ehrlichiosis in Mexico *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), 481. <http://doi.org/10.3201/eid0503.990327>
6. Donatien A., Lestoquard F., (1935) Existence and Algerie d'une rickettsia du chien. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 28:418–419.
7. Skotarczak, B. (2003). Canine ehrlichiosis. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, 10(2), 137–141. <http://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182354b7e>

8. Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., & Keysary, A. (1997). Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69(3–4), 307–317.  
[http://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01130-2](http://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01130-2)
9. Huxsoll D., (1976). Canine Ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): A review, *Veterinary Parasitology*, 2(4): 49-60, DOI: 10.1016/0304-4017(76)90052-2.
10. Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J. M., Greene, R., Kim, H. Y., Zhi, N., Bartsch, R. (1997). Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology.*, 35(7), 1852–1856.
11. Núñez-Ochoa, L., García, C, (1996). Pancitopenia Tropical. *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas*, 7 (6) 235-236.
12. Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(2), 276–283.  
<http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>
13. Pat-Nah, H., Rodriguez-Vivas, R. I., Bolio-Gonzalez, M. E., Villegas-Perez, S. L., & Reyes-Novelo, E. (2015). Molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 52(1), 101–104.  
<http://doi.org/10.1093/jme/tju010>

14. [DOF] Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos, las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos, Mayo 2016, México D.F.
15. Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., Kyrpides, N. C. (2006). The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4015–4023. <http://doi.org/10.1128/JB.01837-05>
16. Ewing, S. A. (1963). Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 143:503–506.
17. Jere W. McBride, D. H. W. (2013). Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 125(21), 2621–2629. DOI: 10.1017/S1462399410001730.
18. Hildebrandt, P. K., J. D. Conroy, A. E. McKee, M. B. Nyindo, & D. L. H. (1973). Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *American Society for Microbiology*, 7(2), 265–271.
19. Da Costa Vieira R. F.; Biondo A. W.; Sá Guimarães A. M.; (2011) Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20 (1), 1-12.
20. Levenhagen M.A. (2014) The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion .*Veterinary Microbiology*. 168, 442–446

21. Ferrolhoa J., Simpson J., Hawesa P. (2016) Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines RSE8. *Ticks and Tick-borne Diseases*
22. Popov V.L., Han V.C., Chen S.M., Dumler J.S., Feng H.M., Andreadis T.G., Tesh R.B., Walker D.H. (1998) Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus, *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology* 47(3), 235-51
23. Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R., & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 256–273. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.013>
24. Rikihisa, Y. (2015). Molecular pathogenesis of *Ehrlichia chaffeensis* infection. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 283–304. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104411>
25. Kumar, D. M., Lin, M., Xiong, Q., Webber, M. J., Kural, C., & Rikihisa, Y. (2015). EtpE binding to DNase X induces ehrlichial entry via CD147 and hnRNP-K recruitment, followed by mobilization of N-WASP and actin. *American Academy of Microbiology*. 6(6), 1–12. <http://doi.org/10.1128/mBio.01541-15>
26. Felek, S., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2003). Sequence and expression analysis of virB9 of the type IV secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. *Infection and Immunity*, 71(10), 6063–6067. <http://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6063-6067.2003>
27. Ohashi, N., Zhi, N., Lin, Q., Rikihisa, Y., Ohashi, N., Zhi, N., Rikihisa, Y. (2002). Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic Ehrlichiosis

- agents. *Infection and Immunity*, 70(4), 2128–2138.  
<http://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2128>
28. Liu, H., Bao, W., Lin, M., Hua Niu, & Rikihisa, Y. (2013). *Ehrlichia* type IV secretion effector ECH0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD. *Cellular Microbiology*, 16(3), 387–393.  
DOI:10.1111/j.1462-5822.2012.01775.x
29. Wakeel, A., den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P. J. J., & McBride, J. W. (2011). *Ehrlichia chaffeensis* tandem repeat proteins and Ank200 are type 1 secretion system substrates related to the repeats-in-toxin exoprotein family. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 30, 1-22.  
<http://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00022>
30. Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, 187(3), 292–296.  
<http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
31. Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M., & Harrus, S. (2012). Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 31(1), 226–233.  
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.003>
32. Thirumalapura, N. R., Crocquet-Valdes, P. A., Saito, T. B., Thomas, S., McBride, J. W., & Walker, D. H. (2013). Recombinant *Ehrlichia* P29 protein induces a protective immune response in a mouse model of ehrlichiosis. *Vaccine*, 31(50), 5960–5967. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.036>
33. Thomas S., (2016). Development of Structure-Based Vaccines for Ehrlichiosis. Thomas S., *Vaccine Design, Methods and Protocols: Volume 1:*

*Vaccines for Human Diseases*. Philadelphia, PA, USA, Humana Press, Lankenau Institute for Medical.

34. Cuore U. & MA. Solari. (2014). Multiresistant population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Uruguay. *Sociedad de Medicina Veterinaria Del Uruguay*, 50, 4–13.
35. Harrus, S., Alleman, A. R., Bark, H., Mahan, S. M., & Waner, T. (2002). Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*, 86(4), 361–368. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00022-6](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00022-6)
36. Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J. E., Poland, A. M., & Bark, H. (1998). Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 73–76.
37. Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., & Raoult, D. (2001). Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3031–9. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3031>.
38. Stich, R. W., Rikihisa, Y., Ewing, S. a, Glen, R., Grover, D. L., Jittapalapong, S., & Needham, G. R. (2002). Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30 -based PCR assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(2), 441–449. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.2.540>
39. Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2008). Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs

- surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Journal*, 175(2), 212–217. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.013>
40. Thermo Fisher Scientific Inc. User Guide: InsTAclone PCR™, Cloning Kit InsTAclone PCR Cloning Kit, #K1213, #K1214™.
41. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
42. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., J. G. Seidman; Smith J. A., Struh K., (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, USA. Massachusetts Harvard.
43. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal (2013). *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2014; Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE, Principios y Métodos de Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas.*
44. Monica Ivonne Nuncio Limón, (2013). Capítulo 5. *Uso de la Técnica de RT-PCR y secuenciación para la detección del virus del distemper canino vacunal en muestras clínicas.* [Para obtener título de Médico Veterinario Zootecnista]. Coyoacán D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México
45. Pitcher, D. G., Saunders, N. a., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151–156. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
46. Bionote®, Inc, Doc. No. : 2105-1, Kit del Test Rápido Anigen para *E. canis* Ab 2009.

47. Nuñez Ochoa L., Bouda J., (2007) *Patología Clínica Veterinaria*, 2da Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria. México D.F.
48. Starkey L.A., Barrett A.W., Beall M.J., Chandrashekar R., Thatcher B., Tyrrell P., Little S.E. (2015) Persistent Ehrlichia ewingi i Infection in Dogs after Natural Tick Infestation *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 552-5. doi: 10.1111/jvim.12567.
49. Nair A.D., Cheng C., Ganta C.K., Sanderson M.W., Alleman A.R., Munderloh U.G., Ganta R.R.(2016) Comparative Experimental Infection Study in Dogs with Ehrlichia canis, E. chaffeensis, Anaplasma platys and A. phagocytophilum. *PLoS One*. 11(2):e0148239. doi: 10.1371/journal.pone.0148239. eCollection
50. Viljoen, Gerrit J., Nel, Louis H., Crowther, John R., (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Dordrecht, The Netherlands.
51. Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., & Kimura, K. (1994). Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Journal of Forensic Sciences*, 39(2), 362–372.
52. Al-Soud, W. A., & Rådström, P. (2001). Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 485–493. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.2.485>
53. Weiss, D. J., Wardrop, K., (2010). *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed., Wiley-Blackwell. Singapore.

54. Labarthe, N., Serrão, M. L., Melo, Y. F., De Oliveira, S. J., & Lourenço-de-Oliveira, R. (1998). Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, Oceanic Region of Niterói Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(4), 425–432. <http://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400001>
55. López J., Castillo A., Muñoz M., Hildebrandt S. (1999), *Ehrlichia canis* in Chile; preliminary report. *Archivos de Medicina Veterinaria*, [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X1999000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1999000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=en) [consulta: 08 ago 2016].
56. IDEXX RealPCR™ *Tests Definitive answers through accurate, fast real-time PCR*; <http://www.idexx.com.au/smallanimal/reference-laboratories/testmenu/innovative-tests/real-pcr.html> [Fecha de consulta 23 Septiembre 2016].

## Anexo 1. Medios de Cultivo

### Caldo Luria Bertani (LB)

Cloruro de Sodio (JT Baker®)	10 g
Peptona de caseína (Becton Dickinson®/MCDLab®)	10 g
Extracto de Levadura (Becton Dickinson®)	5 g
Agua destilada	950 mL

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 115 °C.

### Agar LB

Al preparar caldo LB agregar 15 g de agar-bacteriológico (Difco®/ MCDLab®) para 1 L.

### Caldo Luria Bertani (LB) o Agar LB con Ampicilina

Al caldo o al agar posterior a su esterilización agregar de manera aséptica la ampicilina

### Ampicilina

Ampicilina sal sódica (IBI Scientific)	2.5 g
Agua destilada	10 mL

Concentración final 250 mg/mL  
Disolver 2.5 g de ampicilina en 10 mL agua MiliQ homogenizar vigorosamente hasta su disolución, filtrar asépticamente y alícuotar en viales de 1 mL. Conservar a -20°C hasta su uso.

### Medio SOB

Peptona de caseína (Becton Dickinson®/MCDLab®)	20 g
Extracto de Levadura (Becton Dickinson®)	5 g
Cloruro de Sodio (JT Baker®)	0.5 g
Agua destilada	950 mL

Al disolver los componentes adicionar 10 mL de KCl 250 mM, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1 L. Esterilizar durante 20 min, 15 lb de presión y a 115 °C. Antes de utilizar agregar 5 mL de MgCl<sub>2</sub> 2 M.

### Medio SOC

A 1 L de medio SOB agregar 20 mL de glucosa 1 M para obtener una concentración final 20 mM.

## **Anexo 2. Soluciones**

### **Solución TAE 50X**

Tris base (Affymetrix USB®)	242 g
Ácido acético glacial (JT Baker®)	57.1 mL
Ácido Etilen Diamino Tetracético - EDTA (Affymetrix USB®)	37.2 g
Aforar a 1 L de agua destilada.	

Solución de trabajo 1X

### **Amortiguador de carga para ADN**

Glicerol o Sucrosa o Dextrosa (BD Bioxon)/ (sigma-Aldrich®)  
Xilencianol (sigma-Aldrich®)  
Azul de bromocresol (sigma-Aldrich®)

### **Soluciones para extracción de plásmido (Lisis alcalina)**

#### **-Solución I**

50 mM glucosa (BD Bioxon®)  
25 mM Tris – HCl pH 8 (Affymetrix USB®)  
10 mM EDTA pH 8 (Affymetrix USB®)

#### **-Solución II**

0.2 N NaOH (JT Baker®)  
1% SDS (Sigma-Aldrich®)

#### **-Solución III**

5 M Acetato de Potasio (JT Baker®)	60 mL
Ácido Acético Glacial	11.5 mL
Agua Destilada	28.5 mL

### **Soluciones para extracción de ADN**

#### **-Solución de lisis**

5 M tiocianato de guanidina (sigma-aldrich®)  
N-Sarcosyl (sigma-Aldrich®) 0.16%  
EDTA Na pH 8.0 0.5M

#### **-Acetato de amonio 7.4 M**

7.4 M Acetato de amonio (JT Baker®)

- **Cloroformo-alcohol isoamilico**

Cloroformo (JT Baker®)	24 mL
Alcohol isoamilico (JT Baker®)	1 mL

- **Etanol 100%**

Alcohol etílico absoluto (JT Baker®)	100 mL
--------------------------------------	--------

- **Etanol 70%**

Alcohol etílico absoluto (JT Baker®)	70 mL
H <sub>2</sub> O inyectable estéril	30 mL

**Soluciones para Purificación de ADN.**

- **Acetato de sodio 3 M**

3 M Acetato de sodio (JT Baker®)

- **Fenol-Cloroformo-alcohol isoamilico**

Fenol ultra-puro (Invitrogen®)	25 mL
Cloroformo (JT Baker®)	24 mL
Alcohol isoamilico (JT Baker®)	1 mL

**Soluciones y reactivos para la PCR**

- **DNTP's (Invitrogen®/Thermo Scientific Fisher®)**

ATP 100 mM

CTP 100 mM

GTP 100 mM

TTP 100 mM

Agregar 10 µL de cada dinucleótido a 60 µL de agua estéril

- **Iniciadores (Invitrogen®/Sigma Aldrich®)**

Iniciador F' (En sentido) 100 µM

Iniciador R' (Antisentido) 100 µM

Diluir por separado 10 µL de cada iniciador en 90 µL de agua libre de ADNAsas.

- **Polimerasa de *Thermus aquaticus* recombinante (Invitrogen®/Thermo Scientific Fisher®)**

TaqPol 5 U/ µL

Diluir 5 µL en 20 µL de Agua estéril libre de ADNAsas volumen final 25 µL

Concentración final 1U/µL.

### Anexo 3. Costos. Costo en Pesos Mexicanos.

Diagnóstico a partir de ADN recombinante		Extracción a partir de un cultivo celular infectado	
Concepto	Costo Unitario	Concepto	Costo
Caja petri c/ agar	4,15		
Caldo de cultivo	0,46	Cultivo Celular	199,34
Guantes	5,20	Guantes	10,4
Personal técnico	15,00	Personal técnico	50
Disposición de residuos	10,00	Disposición de residuos	10
Pasivos	40,00	Pasivos	150
Reactivos Extracción	15,32	Reactivos Extracción	15,32
Reactivos PCR	112,59	Reactivos PCR	112,59
Electroforesis	184,09	Electroforesis	184,09
Extracción de plásmido	0,56		
Costo de la prueba total	387,37	Costo de la prueba total	731,74
Precio de la prueba total	500,00	Precio de la prueba total	500
Ganancia Neta	<b>112,63</b>	Ganancia Neta	<b>-231,74</b>

#### Cuadro A.1. Costos del diagnóstico realizado con un ADN positivo recombinante y con ADN obtenido mediante un cultivo celular.

En el segundo caso del concepto del cultivo celular, personal técnico capacitado para efectuar esta técnica, los pasivos que incluye el mantenimiento de la línea celular, disparan el costo de la prueba sobre pasando el precio ofertado al público.

Para que sea equivalente la prueba a partir de un control positivo mantenido en una línea celular este diagnóstico por PCR anidada debe costar **844.25 pesos:**  
 $844.25 - 731.74 = 112.51$

El costo total de la prueba realizada con un control positivo mantenido en una línea celular es 52.94% superior al control positivo recombinante:

$$387.37 \times 100 = 38,737$$

$$38,737 / 731.74 = 52.94\%$$

#### Costo del diagnóstico en dólares

A partir de cultivo celular: **40.65 USD\***

A partir de ADN recombinante: **21:10 USD\***

\*Tipo de cambio al día 07/Setiembre/2016 18.36 pesos= 1 dólar

Costo por la extracción de plásmido		
Reactivo	Costo del reactivo	Costo unitario
50 mM glucosa	166.6804	0.37
25 mM Tris – HCl	10,675.48	2.14
10 mM EDTA	5757.08	21.43
0.2 N NaOH	246.5	16.43
1% SDS	3,250.32	325.03
5 M Acetato de Potasio	1,170.79	195.13
Ácido Acético Glacial	621.18	7.76
		568.30
Para una reacción		5.68

Concepto	Costo Unitario	Costo Unitario por Ext. Plásmido
Pasivos		7
Reactivos Ex plásmido		5,68
Puntas de 0.1-10 $\mu$ L	550,44	1,10
Puntas de 20-200 $\mu$ L	526,32	3,16
Tubo cónico de 15 mL	1840,64	7,36
Puntas de 1 mL	526,32	1,58
ARNasa A	60	0,06
		25,94

**Cuadro A.2. Costos de los reactivos de extracción de plásmido para obtener ADN recombinante positivo a *Ehrlichia*.** El concepto obtenido de 568 es suficiente para efectuar aproximadamente 100 extracciones, al precio de la extracción se le debe adicionar el costo de las puntas para micropipetas y el reactivo ARNasa A utilizado en cada extracción de plásmido, así mismo este precio se amortiza porque de una extracción de plásmido a partir de un cultivo de 10 mL es posible diluir el ADN para llevar a cabo un aproximado de 100 reacciones, si el ADN se diluye a una concentración de 100ng/ $\mu$ L.

Concepto	Costo por reactivo e insumo	Costo unitario de reactivo e insumo	Costo unitario por extracción
Puntas de 0.1-10 µL	550,44		1,10
Puntas de 20-200 µL	526,32		2,11
Puntas de 1 mL	526,32		4,21
Tubo de 1.5 mL	205,16		1,23
Tiocianato de Guanidina	8122,32	480,03	
N-sarcosyl	11072,2	5,54	
EDTA	5757,08	21,43	
Total de solución de lisis		507,00	1,78
Acetato de amonio	274,44	4,23	0,006
Fenol	3810,6	190,53	
Cloroformo	1983,91	12,40	
OH isoamilico	1705,2	1,71	
Total de la sol de fenol		204,63	4,09
Etanol abosoluto	1860,67	46,52	0,47
Etanol 70%	1861,67	32,58	0,33
		<b>Total por extracción</b>	<b>15,32</b>

**Cuadro A.3. Costo de los reactivos para la extracción de ADN por el método del tiocianato de guanidina.**

La solución de lisis tiene un costo de 507 pesos, esto es un volumen de 100 mL, por cada extracción se requiere una cantidad de 350 µL, esto hace que el precio por extracción sea de 1.78 pesos.

El acetato de amonio se prepara a 7.4 M en un volumen de 100 mL y por cada extracción se necesita 150 µL lo que le da un costo de 0.006 pesos.

La solución de fenol con cloroformo y alcohol isoamilico con un volumen de 50 mL tiene un precio de 204.63 pesos y se utiliza para el diagnóstico 500 µL, volumen que cuesta 4.09 pesos.

100 mL de etanol absoluto cuestan 46.52 pesos y para un diagnóstico se utiliza 1.5 mL que equivale a 0.47 pesos, el etanol al 70% esta diluido en agua y 100 mL cuestan 32.58 por cada reacción se requiere un volumen de 1 mL que cuesta 0.33 pesos.

Una extracción de ADN a partir de sangre o cultivo celular cuesta 6.67 pesos

En el caso de la extracción de ADN se debe incluir el uso de puntas para micropipetas de diferentes volúmenes utilizadas en las diferentes etapas de la extracción.

Concepto	Costo	Costo de la PCR anidada
Puntas de 0.1-10 $\mu$ L	550,44	3,30
Puntas de 20-200 $\mu$ L	526,32	0,53
Tubos para PCR	643,43	2,57
H2O c.b.p.50 $\mu$ L.: 33.5 $\mu$ L	4	0,05
Polimerasa (Taq).1U/Buffer 10X.5 $\mu$ L/MgCl2..3.5 $\mu$ L	4285,26	17,14
DNTP's 1 $\mu$ L	5298,84	2,65
Iniciador consentido 1 $\mu$ L/Iniciador antisentido 1 $\mu$ L	3799,72	1,90
Volumen total 50 $\mu$ L	Total	<b>112,59</b>

**Cuadro A.4. Costo total de un diagnóstico con la PCR anidada.** Se debe incluir una muestra, un control positivo de extracción, un control positivo de reacción y un control negativo, esta reacción al ser anidada se hace en dos rondas lo que da un equivalente de ocho reacciones por diagnóstico.

Todos los reactivos de la reacción son adquiridos en estock y deben diluirse, al momento de llevar a cabo la reacción se usan cantidades de 1  $\mu$ L como la polimerasa y los iniciadores.

El agua inyectable es un concepto mayor que el agua destilada ya que es estéril, libre de pirógenos y libre de endonucleasas, para cada reacción se necesita un volumen de 33.5  $\mu$ L

Costo de la Electroforesis por PCR anidada		
Concepto	Costo Unitario de reactivo e insumo	Costo por un diagnóstico
Agarosa	10939,98	32,82
TAE	954,68	95,47
Agarosa por DX		38,49
MPM	13023,9	26,05
Puntas de 0.1-10 $\mu$ L	550,44	5,50
Puntas de 20-200 $\mu$ L	526,32	0,53
Amortiguador de carga	321,6	18,01
Bromuro de Etidio	1289,92	0,05
TAE para Electroforesis	954,68	95,47
Total de la Electroforesis		<b>184,09</b>

**Cuadro A.5. Costo de la Electroforesis para un diagnóstico.** El concepto de la electroforesis es más elevado que el de la extracción y de la PCR (Cuadro A.3. y Cuadro A.4.).

Tomando en cuenta que la agarosa se prepara en un volumen de 100 mL y por cada diagnóstico se gastan 30 mL de agarosa.

El marcador de peso molecular (MPM) se comercializa concentrado y dado que para cada gel se requieren 4  $\mu$ L por ello un vial con 1 mL es suficiente para 250 geles.

El bromuro de Etidio se prepara en un volumen de 1 mL y se diluyen 200  $\mu$ L en 100 mL de agua esto es suficiente para teñir 30 geles o 15 diagnósticos.

Con respecto al amortiguador de carga se prepara en concentración de 6X en volúmenes de 5 mL y se diluye a 1X en 1 mL.

Concepto	Costo por reactivo e insumo	Costo por un diagnóstico
Filtro	1982,6	165,22
Caja de Cultivo	2359,44	11,80
RPMI	897,85	2,69
SFB	5498,61	6,60
Pipeta Serológica	1596,78	12,77
Glutamina	519,84	0,26
Puntas de 0.1-10 µL	550,44	1,65
Puntas de 20-200 µL	526,32	4,21
Puntas de 1 mL	526,32	4,21
Tubo de 1.5 mL	205,16	1,64
Tubo cónico de 15 mL	1840,64	7,36
Piruvato	192,78	0,10
		199,34

**Cuadro A.6. Costo del mantenimiento de un control positivo basado en *Ehrlichia* infectando una línea celular por 7 días.**

Medio de cultivo RPMI por lo general se adquiere deshidratado para preparar volúmenes de 10 L, para mantener una línea celular en una botella de 25 mL durante siete días cambiando medio cada tercer día se requiere 30 mL, esto es si se trabaja con un volumen de 10 mL el cultivo.

Suero fetal bovino se adquiere en volúmenes de 500 mL y debe diluirse en el medio para que quede a una concentración de 2%

Respecto al piruvato y glutamina se adquieren en volúmenes de 20 mL y con ellos se suplementa el medio de cultivo.

Mantenimiento de una Cepa recombinante para un DX		
Concepto	Costo por reactivo o insumo	Costo por un diagnóstico
Caja petri	997,6	1,8
Agar	1546,28	46,39
Peptona	1.053	21,07
Extracto	1102	11,02
NaCl	2748,62	13,74
Costo por litro de agar		92,22
Costo por litro de caldo		45,83
Costo de mantenimiento de una cepa para UN Dx		4,15

**Cuadro A.7. Costo del mantenimiento de una bacteria con el ADN recombinante positivo a *Ehrlichia*.** Los reactivos son adquiridos en stock y se preparan en volúmenes de 1 L, 500 mL, 250 mL, el agar se distribuye en las cajas de Petri en un volumen de 25 mL, el caldo se alícuota en volúmenes de 10 mL

Costo de una Prueba Serológica de Anigen®		Costo de una Prueba Serológica de IDEXX®	
Concepto	Costo por reactivo	Concepto	Costo por reactivo
Panel	185,59	Panel	318,13
Guantes	2,6	Guantes	2,6
Personal técnico	5	Personal técnico	5
Disposición de residuos	10	Disposición de residuos	10
Pasivos	7	Pasivos	7
Total	210,19	Total	342,73
Costo de la prueba total	260	Costo de la prueba total	380
Ganancia Neta	49,81	Ganancia Neta	37,27

**Cuadro A.8. Costo de realización de las pruebas serológicas.** Para el caso de la prueba de Anigen cuyo precio al público fue obtenido con respecto a laboratorios y farmacias que ofertan la prueba al público en general en 260 pesos.

La prueba serológica de IDEXX Snap 4 Dx® se oferta en el departamento de patología de la FMVZ en 380 pesos al público (**precio al día 23 de septiembre de 2016**), la ventaja que tiene ante la prueba de Anigen es que puede dar otros cuatro diagnósticos en el estuche que es *Borrelia* sp. *Anaplasma* sp. y *Dirofilaria* sp.

Debido al mantenimiento especial en refrigeración y el contenido ofertado la prueba tiene un precio de 318 pesos para que sea rentable su uso debe ofertarse desde 400 hasta 450 pesos

En ambos estuches comerciales no se conoce en su totalidad la composición antigénica del reactivo.

Concepto Cultivo Celular	Concepto ADN Recombinante
Centrífuga	Centrífuga
Incubadora para cultivo celular	Incubadora
Termociclador	Termociclador
Ultra congelador	Ultra congelador
Congelador	Congelador
Refrigerador	Refrigerador
Máquina de Hielo	Máquina de Hielo
Tanque de CO <sub>2</sub>	Computadora
Campana de flujo Laminar	Impresora
Microscopio invertido para cultivo celular	Electricidad
Computadora	Mesas de trabajo
Impresora	Asas Microbiológicas
Electricidad	Gradillas
Mesas de trabajo	Gas
Autoclave	Potenciómetro
Bomba de vacío	Agitador de vórtice (Vortex)
Gradillas	Agitador Magnético
Manguera	Cámara de electroforesis
Potenciómetro	Fuente de poder
Agitador de vórtice (Vortex)	Digitalizador o Transiluminador
Agitador Magnético	Cristalería
Cámara de electroforesis	Mechero
Fuente de poder	Encendedor
Digitalizador o transiluminador	Marcador indeleble
Cristalería	Aspersores
Marcador indeleble	
Aspersores	

**Cuadro A.9. Se Muestran los conceptos pasivos utilizados en el diagnóstico mediante PCR con control positivo mantenido en cultivo celular y control positivo recombinante.** Los insumos utilizados en cultivo celular modifican el costo de los pasivos debido a su complejidad y cuidado