

ENFERMEDADES INFECCIOSAS

COMPARACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE *EHRlichia CANIS* EN EL PERRO

E. Aguirre*, M. A. Tesouro**, I. Amusatogui*, Á. Sainz.*

*Facultad de Veterinaria de Madrid.

**Facultad de Veterinaria de León.

O bjetivos del estudio

Los objetivos de este trabajo son comparar distintos protocolos de PCR previamente descritos (Wen, 1997; Murphy, 1998, Breitschwerdt, 1998 y Harrus, 1998) destinados al diagnóstico de la infección por *Ehrlichia canis* mediante PCR, así como analizar los resultados obtenidos con cada una de estas técnicas y relacionarlos con la presencia de anticuerpos (mediante IFI) y la sintomatología presente en cada animal.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron 18 perros, previamente analizados por IFI frente a *Ehrlichia canis*: 9 de ellos eran seropositivos y 9 seronegativos. De cada uno de los perros incluidos en el estudio se extrajo una muestra de sangre en EDTA para su análisis por PCR. La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 200 ml de sangre, siguiendo las instrucciones de un kit comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit). Como control positivo se empleó ADN extraído a partir del sobrenadante de un cultivo infectado con *Ehrlichia canis*. También se incluyeron varios controles negativos con agua destilada estéril. 4 de los 5 protocolos empleados utilizan los mismos cebadores, con modificaciones en la concentración de los reactivos, la temperatura y/o la duración de cada ciclo. El quinto protocolo (concretamente, el descrito por Breitschwerdt en 1998) utiliza un par de cebadores distinto, pero dirigido a amplificar el mismo gen que los anteriores (16S rRNA).

Resultados

Mediante PCR se obtuvieron distintos resultados en función del protocolo utilizado. De los 9 perros positivos por IFI, únicamente 3 fueron positivos con todas las técnicas de PCR empleadas. Con las 6 muestras positivas restantes se obtuvo un resultado variable en función del método aplicado. Los 9 perros negativos por IFI fueron negativos por PCR, excepto 2 que mostraron un resultado PCR positivo con tan solo una de las técnicas utilizadas.

Al relacionar estos resultados con la historia clínica de los animales, destacamos que 2 de las 3 muestras consideradas positivas por PCR procedían de perros con sintomatología claramente compatible con un cuadro de ehrlichiosis canina. La tercera de estas muestras pertenecía a una perra con diabetes mellitus diagnosticada y controlada previamente que acudió a la consulta por una descompensación de su enfermedad tras una infestación masiva por garrapatas.

Conclusiones

En principio, con la técnica PCR se puede conseguir un alto grado de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. No obstante, las discrepancias encontradas en nuestros resultados en función del método de PCR utilizado, justifica la optimización de las condiciones de la técnica en cada laboratorio de diagnóstico. La especificidad de la técnica depende, en gran medida, de los cebadores empleados. En este estudio, los cebadores utilizados amplifican parcialmente el gen 16S rRNA, un

gen altamente conservado a lo largo de la evolución. A medida que se vayan conociendo y secuenciando nuevos genes de *E. canis*, se facilitará el camino hacia el diseño de cebadores específicos capaces de amplificar secuencias de ADN exclusivas de *E. canis*.

