

DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS EQUINA VENEZOLANA MEDIANTE LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Diagnosis of Venezuelan Equine Anaplasmosis by Polymerase Chain Reaction.

María Eugenia Párraga^{1,2,*}, Mary Isabel Gonzatti¹ y Pedro María Aso¹.

1. Depto. Biología Celular, Grupo de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, Caracas, Distrito Capital. 2. Depto. Médico-Quirúrgico, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua. *mparragacomplete@gmail.com.

RESUMEN

La anaplasmosis, causada por *Anaplasma phagocytophilum* es una zoonosis que además de afectar al hombre, puede provocar enfermedad en caballos (*Equus caballus*), burros (*Equus africanus asinus*), grandes y pequeños rumiantes (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra aegagrus hircus*), perros (*Canis lupus familiaris*), gatos (*Felis catus*), primates no humanos (*Macaca mulatta*, *Papio spp.*), aves (*Turdus merula*, *Erithacus rubecula*, *Fringilla coelebs*), cerdos silvestres (*Sus scrofa*) y llamas (*Lama glama*). En los laboratorios nacionales, el diagnóstico de *A. phagocytophilum* se lleva a cabo mediante la observación a través del microscopio de luz en frotis de capa blanca teñidos, de cuerpos iniciales y/o mórulas intracitoplasmáticas en neutrófilos y eosinófilos. Esta prueba, aunque sencilla de realizar, es muy limitada por su baja sensibilidad y especificidad. La anaplasmosis equina no ha sido adecuadamente diagnosticada y caracterizada en Venezuela, poco se conoce acerca de su epidemiología, su prevalencia, diversidad y patogenicidad de cepas venezolanas, su distribución geográfica o sobre sus vectores más comunes. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la presencia de *A. phagocytophilum* en poblaciones equinas venezolanas mediante el uso de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la presente investigación se utilizó una prueba de PCR especie-específica con cebadores que amplifican un fragmento de 550 pb del gen que codifica la proteína de superficie P44. Se demostró por PCR, así como por frotis de capa blanca, la ausencia de *A. phagocytophilum* en doscientas muestras de sangre de ejemplares equinos sin signos aparentes de enfermedad, provenientes de diferentes regiones de la geografía nacional. Algunas de las posibles causas por las que no se encontraron casos positivos incluyen: el muestreo no coincidió con zonas geográficas endémicas asociadas a formas subclínicas de enfermedad; el exceso de ADN del hospedador proveniente de la capa blanca pudo haber interferido con la amplificación del blanco de interés; condiciones epizootiológicas que no favorecieron la ocurrencia de la enfermedad, incluyendo habitat no propicio, ausencia de vectores y reservorios, y/o falta de una adecuada interacción entre hospedador-reservorio en las zonas exploradas.

Palabras clave: *Anaplasma phagocytophilum*; anaplasmosis equina; PCR; diagnóstico.

ABSTRACT

The disease caused by *Anaplasma phagocytophilum* is a zoonosis, that affects not only humans, but also horses (*Equus caballus*), donkeys (*Equus africanus asinus*), large and small ruminants (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra aegagrus hircus*), dogs (*Canis lupus familiaris*), cats (*Felis catus*), non-human primates (*Macaca mulatta*, *Papio spp.*), birds (*Turdus merula*, *Erithacus rubecula*, *Fringilla coelebs*), wild hogs (*Sus scrofa*) and lamas (*Lama glama*). National laboratories, the diagnosis of *A. phagocytophilum* is performed by examining stained buffy coat smears with light microscopy to detect initial bodies and/or intracitoplasmic morulas within neutrophils and eosinophils. This test is simple to perform, but it has limited sensitivity and specificity. Equine anaplasmosis has not been adequately diagnosed and characterized in Venezuela, so little is known about its epidemiology, its prevalence, the diversity and pathogenicity of Venezuelan strains, their geographic distribution or the most common vectors. The objective of the study was to use polymerase chain reaction (PCR) to screen for the presence of *A. phagocytophilum* in Venezuelan equine populations. The species-specific PCR test used primers would amplify a 550 bp fragment of the gene encoding the P44 surface protein. Surprisingly, neither the PCR test nor the buffy coat smears detected the presence of *A. phagocytophilum* in any of the two hundred blood samples from horses with no apparent signs of disease sampled from different geographic regions of Venezuela. Possible reasons for the failure to detect *A. phagocytophilum* include, the sampling did not comprise endemic areas associated with subclinical forms of the disease; excess of gDNA from the host buffy coat may have interfered with the amplification of the target of interest; and epizootiological conditions that did not favour disease occurrence, including unsuitable habitat patches, absence of vectors and reservoirs, and/or lack of an adequate host-reservoir interaction in the explored areas.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*; equine anaplasmosis; PCR; diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia equi fue reclasificada como una bacteria perteneciente a la familia *Anaplasma* taceae con el nombre de *Anaplasma phagocytophilum* [14]. La razón que justificó esta reclasificación se fundamentó en similitudes establecidas a través de estudios serológicos [13, 14] y moleculares de diferentes aislados [12, 14].

La anaplasmosis equina causada por *A. phagocytophilum*, cursa con signos clínicos inespecíficos como fiebre, letargia, depresión, inapetencia [19, 21, 35], edema en miembros, ictericia y ataxia [29, 35], los cuales han sido estudiados en infecciones naturales [29] ó experimentales [19, 21]. A pesar de estas observaciones, algunos autores han definido la enfermedad como una infección autolimitante [31], ya que sus signos clínicos pueden desaparecer sin tratamiento, entre 7–21 días (d) postinfección [21, 32]. La persistencia de la infección, de acuerdo a estudios experimentales, es de aproximadamente 4 meses después de la inoculación del agente [21].

La técnica de la PCR se destaca por su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad [18, 44], es esencialmente rápida [41, 53] y requiere de una buena muestra de sangre y del ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg) a procesar [18]. En infecciones experimentales con *A. phagocytophilum*, la PCR resultó positiva 2-3 d antes de la aparición de signos clínicos y persistió 4-9 d más allá de la desaparición de los mismos [20].

En países como Venezuela, la inversión inicial en equipos para realizar ensayos de diagnóstico por PCR es costosa. No obstante, desde el punto de vista de la salud animal y pública, el costo-efectividad debe ser evaluado a la luz de aquellos gastos en los que se incurre cuando no se diagnostica la enfermedad o es detectada muy tarde [46] o, por el contrario, la rápida y oportuna detección del microorganismo previene la posible infección en humanos [41]. En ausencia de una adecuada evaluación de laboratorio, se suma además el costo de terapias desacertadas y el deterioro del paciente que no es tratado de manera apropiada. Ello sin dejar de lado la problemática de la resistencia a drogas cuando éstas se usan indiscriminadamente por la falta de un diagnóstico veraz. Las pruebas moleculares tienen que ser manejadas por laboratorios reconocidos, que cuenten con estrictos controles de calidad [44].

La necesidad de un mayor número de estudios más precisos sobre *A. phagocytophilum* ha estado pendiente por muchos años en Venezuela. Los primeros fueron realizados en el estado Zulia en caninos (*Canis lupus familiaris*) [3] y equinos (*Equus caballus*) [4] y su evaluación para el momento, se realizó por frotis de capa blanca. Arraga-Alvarado y col. [4] utilizaron 232 muestras de sangre, en su mayoría pertenecientes a ejemplares purasangre de carrera alojados en el Hipódromo Nacional de Santa Rita. Posteriormente, se intentó confirmar la presencia de *A. phagocytophilum* de una de estas muestras de un ejemplar canino proveniente de los estudios de Arraga-Alvarado [3], a través de la PCR mediante la amplificación de la secuencia 16S

del ácido desoxirribonucleico ribosomal (ADNr) [47], pero al año siguiente, fue identificado como falso positivo por los autores [48]. Más recientemente, se realizó el estudio de *A. phagocytophilum* en 137 muestras de caballos criollos del estado Apure [11], con prevalencia de infección del 32,8 % a través de la observación de frotis de capa blanca. No se reportan en la literatura venezolana otras publicaciones relacionadas con el tema.

El diagnóstico de *A. phagocytophilum* en laboratorios nacionales se ha venido llevando a cabo en los últimos años de forma rutinaria a través de la observación de cuerpos iniciales y/o mórulas intracitoplasmáticas en neutrófilos y eosinófilos en frotis teñidos de capa blanca. Esta prueba, aunque sencilla de realizar, es muy limitada por su baja sensibilidad y especificidad lo que la hace subjetiva debido a que: (1) depende de la visualización y criterio del observador, es decir de su experiencia [18]. El falso positivo puede ocurrir en situaciones en las que se observen granulaciones en neutrófilos, cuerpos de Döhle, plaquetas sobrepuestas ó partículas contaminantes [51]; (2) su interpretación depende de la calidad del frotis preparado. Adicionalmente, para el caso de infecciones en equinos por este microorganismo, los cuerpos de inclusión no son evidentes durante los primeros días de enfermedad [20]. De tal forma, que el resultado dependerá de la fase de la enfermedad en la que sea tomada la muestra. Debido a su subjetividad, es una prueba fácilmente asociada a resultados falsos positivos y falsos negativos [18].

Por todo lo anteriormente expuesto, la anaplasmosis equina en la actualidad pudiera no haber sido caracterizada, documentada ni valorada adecuada y suficientemente en Venezuela. Poco se sabe sobre su epidemiología, la prevalencia de la enfermedad, la biodiversidad y patogenicidad de cepas venezolanas, así como su distribución geográfica y sus vectores, entre otros aspectos.

Desde un punto de vista de tratamiento, la disponibilidad de pruebas moleculares confiables en laboratorios de referencia, ayudaría al médico veterinario practicante a confirmar una infección, de forma tal que utilice el medicamento apropiado en el momento oportuno. El paciente enfermo de alto riesgo estaría expuesto a menor número de fármacos que, de otra forma se administrarían producto de una terapia desacertada, lo que evitaría su consiguiente deterioro clínico o el desarrollo de resistencia por parte del agente infeccioso. Esto además redundaría en un significativo ahorro económico por parte del propietario del ejemplar, menor uso de fármacos y preservación del bienestar clínico de su animal.

En un estudio realizado por Lin y col. [28], los autores señalan que mientras *A. phagocytophilum* contiene en su genoma *p44*, *msp2* y *omp-1*, otros miembros de la familia *Anaplasmataceae* (*Anaplasma marginale* y *Ehrlichia* spp.) carecen de *p44*. La super familia OMP-1/MSP2/P44 también conocida como Pfam o PF01617 [17, 37], codifica proteínas de superficie y son únicas en la familia *Anaplasmataceae* [37]. La PCR basada en un fragmento del gen que codifica la proteína P44 de *A. phagocytophilum* realizada con los cebadores 3709/4257, es especie-específica [52].

Las grandes explotaciones dedicadas a la cría del purasangre de carrera en Venezuela, se encuentran ubicadas en los estados Zulia, Falcón, Carabobo y Aragua. En tanto que los rebaños de caballos criollos, descendientes de ejemplares ibéricos de la época de la conquista, son utilizados en las labores del campo, en estados predominantemente ganaderos como Apure y Guárico. También se suman al rebaño de trabajo y en menor proporción, los híbridos obtenidos del cruce con burro (*Equus africanus asinus*).

El presente trabajo constituye una primera aproximación al estudio de *A. phagocytophilum* en el país, mediante el uso de una herramienta molecular como lo constituye la PCR, con muestreos de ejemplares equinos de las regiones previamente mencionadas. Se requieren estudios epidemiológicos adicionales que estimen el número adecuado de muestras necesarias, para determinar la verdadera prevalencia de este agente causal en los distintos rebaños venezolanos.

El diagnóstico molecular por PCR de *A. phagocytophilum* complementa la prueba clásica de observación por microscopía de frotis de capa blanca a fin de lograr una mayor confianza en los resultados de laboratorio. Por esta razón, el propósito del presente trabajo fue evaluar mediante el uso de la PCR la presencia de *A. phagocytophilum* en poblaciones equinas venezolanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de sangre provenientes de ejemplares equinos, mayores de 2 años, sin signos aparentes de enfermedad sistémica (n= 200), fueron obtenidas por punción de la vena yugular, en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, EUA) estériles con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), debidamente identificadas y frescas con el fin de preservar la citología intacta y preparar los frotis de capa blanca. Las muestras se obtuvieron en seis Estados: Apure (n= 60), Distrito Capital (n= 57), Carabobo (n= 49), Zulia (n= 18), Guárico (n= 10) y Aragua (n= 6) (TABLA I). Setenta y ocho muestras fueron recolectadas en los estados Apure (n=60) y Zulia (n= 18), por haber sido estas dos entidades federales cuna de los primeros estudios de anaplasmosis equina en el país y ciento treinta ejemplares (130/200) pertenecientes a las razas purasangre de carrera, cuarto de milla, caballos de silla europeos y mestizos derivados de ellas de los estados Carabobo, Zulia, Aragua y Distrito Capital. Las muestras procedentes del estado Carabobo fueron recolectadas en un club de salto y en una clínica veterinaria. Las muestras recolectadas en el estado Zulia procedieron de haras de purasangre de carrera. Las muestras procedentes del estado Aragua se recolectaron en una clínica veterinaria. En el Distrito Capital, las muestras equinas procedieron de tres diferentes locaciones: Hipódromo "La Rinconada", de un club de salto y adiestramiento y de un zoológico. Setenta ejemplares (70/200) de la raza caballo criollo (*Equus caballus*) e híbridos de éstos con burro (mulas y burdéganos *Equus caballus x Equus africanus asinus*) de hatos ganaderos, muchos sin domesticar, procedieron de los estados Apure y Guárico.

TABLA I
RESUMEN DE LA PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS EQUINAS

Ciudad, Estado	Nro de muestras	Nro de locaciones
San Fernando, Apure	60	2
Caracas, Distrito Capital	57	3
Valencia, Carabobo	32	1
Mariara, Carabobo	17	1
Maracaibo, Zulia	18	2
Guardatinajas, Guárico	10	1
Maracay, Aragua	6	1
Total	200	11

Con la finalidad de obtener preparaciones con citología intacta, maximizar el análisis y minimizar artefactos morfológicos producto de un prolongado almacenamiento de las muestras sanguíneas que pudiesen interferir con su interpretación, los frotis fueron elaborados el mismo día de su recolección [33]. Para la preparación de los frotis de capa blanca se llenaron tubos capilares y se centrifugaron en centrífuga para microhematocrito (Clay Adams Readacrit®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ 07417-1880, EUA) a 7.000xg por 5 minutos (min). Posteriormente, se cortaron los capilares por encima de la región de la capa blanca, en la interfase del paquete de glóbulos rojos y plasma, para realizar frotis en láminas portaobjetos nuevas, los cuales fueron teñidos con coloración de Diff Quick® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA 15275, EUA) o Hemacolor® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Una muestra se consideró positiva cuando se observaron mórulas o cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en su evaluación, mediante el uso de microscopio de luz (Nikon® binocular modelo SC tipo 102, Nikon Corporation, Tokyo, Japón) con el objetivo de inmersión de 100X, en por lo menos tres neutrófilos a través del recorrido de la preparación [32].

Seguidamente, las muestras de sangre fueron transportadas en hielo y se preservaron en refrigeración a 4 °C (nevera LUF14, Luferca, Caracas, Miranda 1071, Venezuela). Una vez extraído el ADNg, se almacenaron a -20 °C (congelador 370, Admiral, Caracas, Miranda 1071, Venezuela). Para el procedimiento de extracción se utilizó el estuche comercial para purificación de ADN (Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega®, Promega Corporation, Madison, WI 53711, EUA). Se tomó 300 µL con micropipeta de punta estéril de la zona alrededor de la capa blanca.

Para la amplificación del fragmento del gen que codifica la proteína P44 de *A. phagocytophilum*, se emplearon los cebadores sentido p3709 y antisentido p4257 [52], los cuales generan un amplicón de 550 pb. La mezcla de reacción contenía la solución tampón 1 X sin Mg (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), dNTPs (dGTP 0,2 mM; dTTP 0,2 mM; dCTP 0,2 mM; dATP 0,2 mM), MgCl₂ 2 mM; Taq Platinum ADN polimerasa 0,025 U/mL y los cebadores a 0,4 µM. La mezcla final con un volumen de 12,5 µL, se sometió a 40 ciclos de reacciones, en termocicladores

automáticos para PCR punto final (Eppendorf® Mastercycler® ep, Eppendorf AG, Hamburg 22339, Alemania; Bioer® XPCycler® Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd. Hangzhou 310053, China; Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems Life Technologies, Grand Island, NY 14072, EUA). La temperatura de hibridación o alineación se ajustó a 60° C. El ciclo consistió de un precalentamiento de 94° C por espacio de 5 min, posteriormente ciclos consecutivos de 1 min a 94° C, 1 min a una temperatura de alineación de 60° C y 1 min de extensión a 72° C, con 7 min finales de extensión en el último ciclo. Los productos de la reacción se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v por tinción con Sybr Safe® o bromuro de etidio, mediante el uso de un documentador de geles (Digidoc® UVP, Upland, CA 91786, EUA; GE ImageQuant LAS-3000®, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, EUA). El control positivo utilizado consistió en el ADN_g molde obtenido de láminas comerciales para inmunofluorescencia indirecta de *Anaplasma phagocytophila* (FA Substrate Slide VMRD®= AphVMRD, VMRD, Inc., Pullman, WA 99163, EUA) [1].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las preparaciones de capas blancas teñidas de muestras de sangre de los doscientos ejemplares equinos (n= 200) fueron revisadas y no se observaron mórulas o cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en neutrófilos o eosinófilos en ninguna de las muestras.

La FIG. 1 corresponde a una de las electroforesis en agarosa de los amplicones obtenidos de la PCR con los cebadores sentido p3709 y antisentido p4257 que muestra la ausencia del amplicón esperado de 550 pb en el grupo de equinos evaluados, indicando el resultado negativo para *A. phagocytophilum*. Las doscientas muestras de ADN_g equinas (TABLA I, FIG. 1) fueron diagnosticadas negativas a infección por *A. phagocytophilum* a través de los resultados obtenidos de la PCR especie-específica para el fragmento del gen *p44* con los cebadores p3709/p4257. En el carril de la reacción con el ADN_g de la muestra control positivo de *A. phagocytophilum*, se observa la banda de tamaño esperado, correspondiente a la amplificación del fragmento del gen *p44*, de acuerdo a marcadores de peso molecular.

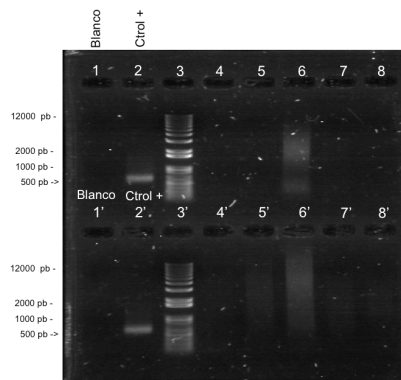


FIGURA 1. PCR *p44* CON CEBADORES P3709/P4257 Y MUESTRAS DE EQUINOS DEL ESTADO ZULIA. (1) BLANCO. (2) CONTROL POSITIVO *A. Phagocytophilum*. (3) MARCADOR 1 KB. (4) MUESTRA 1. (5) MUESTRA 2. (6) MUESTRA 3. (7) MUESTRA 4. (8) MUESTRA 5. (1') BLANCO. (2') CONTROL POSITIVO *A. Phagocytophilum*. (3') MARCADOR 1 KB. (4') MUESTRA 6. (5') MUESTRA 7. (6') MUESTRA 8. (7') MUESTRA 9. (8') MUESTRA 10.

Han transcurrido veinticuatro años desde que se publicó el primer artículo sobre anaplasmosis equina en Venezuela [4] fundamentado en la observación de frotis teñidos de capa blanca y hasta los momentos, no se conocen estudios de diagnóstico molecular complementarios. El presente estudio utilizó muestras de sangre de caballos sin signos clínicos aparentes de enfermedad, dado que diversos autores han reportado que la anaplasmosis equina es una enfermedad que puede cursar de manera subclínica [30, 36, 45], particularmente en caballos de áreas endémicas [30].

En estudios recientes de seroprevalencia de infección por *A. phagocytophilum*, se determinaron tamaños adecuados de muestras en relación a una prevalencia estimada de enfermedad [27, 43]. Inclusive, una de estas publicaciones ajustó el número de muestreos por zonas geográficas exploradas [43]. La prevalencia de la anaplasmosis equina en algunas regiones de

Venezuela, fundamentada a través de la observación de frotis de capa blanca teñidos, osciló entre 32,8% (45/137 [6]) y 36,9% (232/629 [4]). Buena parte [4] o la totalidad [11] de los ejemplares positivos fueron asintomáticos. En uno de los trabajos, además de los asintomáticos, algunos caballos positivos exhibieron signos clínicos entre leves a severos [4]. Ninguno de los 200 ejemplares incluidos en el presente estudio mostró signos clínicos de la enfermedad.

El hecho de no encontrar ningún caso positivo en las doscientas muestras procesadas pudo deberse a diversas razones. Una de ellas, que efectivamente no se haya explorado una zona geográfica endémica [30] que pudiera alojar a ejemplares afectados con la forma subclínica de la enfermedad. Otra consideración es que el ADN_g fue extraído a partir de la interfase entre el paquete de glóbulos rojos y el plasma, conocida también como capa blanca, tal como han reportado otros autores,

que han utilizado este tipo de muestra con éxito en su diagnóstico [2, 34]. No obstante, el exceso de ADNg del hospedador [26] proveniente de la capa blanca pudo haber interferido con la adecuada amplificación del blanco de interés, si alguna de las muestras hubiese correspondido a un ejemplar con una infección subclínica con *A. phagocytophilum*, y un bajo número de microorganismos circulantes. El ADNg del hospedador puede competir como blanco en la alineación de los cebadores [26].

La transmisión del *A. phagocytophilum* ocurre por vectores hematófagos de la super familia de los ácaros, conocidos como garrapatas. Mayormente se ha incriminado al género *Ixodes*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* [7, 9, 10, 15, 22, 23, 35, 38] como principal vector de la enfermedad. No obstante, estudios más recientes en los que se utilizó la PCR, demostraron no solo la presencia del agente en garrapatas del género *Dermacentor*, sino también su transmisión transovárica [5], que hasta los momentos había sido cuestionada [14], lo que constituye otro argumento más para su mantenimiento y persistencia en la naturaleza [5]. Estudios a base de ensayos moleculares en Israel permitieron aislar *A. phagocytophilum* de garrapatas de los géneros *Rhipicephalus* y *Hyalomma* [25].

Se conocen como reservorios de la enfermedad los roedores silvestres (*Peromyscus leucopus*) [6, 7, 16, 19, 50], el ratón doméstico (*Mus musculus*) [6] y venados (*Odocoileus virginianus*) [16, 42]. En un estudio realizado en Inglaterra se determinó un 6,7% de 163 roedores silvestres (*Microtus agrestis*) positivos por PCR a *A. phagocytophilum* [8]. La infección en roedores se manifiesta como una bacteremia transitoria [16], la cual puede presentarse como infección de corta ó larga duración, dependiendo de la especie afectada [8]. Por el contrario, en el venado la infección es persistente y no cursa con signos de enfermedad [16].

La ausencia de infección por *A. phagocytophilum* determinada en el presente estudio, pudo también haber estado relacionada con la escasez o inexistencia de vectores y reservorios competentes [49], y por ende de la distribución geográfica del agente causal e incidencia de la enfermedad en las regiones del muestreo. Estudios epidemiológicos señalan que el área de endemicidad de una enfermedad depende de múltiples variables tales como: condiciones de hábitat, necesidades de alimentación de la garrapata, presencia de reservorios e interacción entre hospedador-reservorio [39, 49]. Por otra parte, los caballos criollos e híbridos de éstos pertenecientes a rebaños salvajes, no domados, fueron colocados sin previa selección para la recolección de las muestras, en una manga empleada para el manejo de ganado bovino, sin haber contado con atención periódica, ni planes sanitarios rigurosos ni suplementos alimenticios, otros que los ofrecidos por la vasta extensión de la llanura. En los centros ecuestres e hipódromos nacionales donde también se muestreó, sucede todo lo contrario, los ejemplares

son celosamente sometidos a estrictos controles sanitarios por su alto costo económico. Dada la alta seroprevalencia de piroplasmosis (50,2%) en Venezuela [40], los tratamientos profilácticos utilizados contra las hemoparasitosis se limitan a la utilización de imidocarb y diminaceno diacetato, ambos sin acción efectiva contra *A. phagocytophilum*. Los ejemplares equinos incluidos en la investigación, no presentaron historia de tratamiento reciente con oxitetraciclina.

La PCR para el blanco definido por el fragmento del gen *p44* de *A. phagocytophilum* realizada con los cebadores 3709/4257, es especie-específica [52], a diferencia de la PCR para el gen ribosomal 16SARNr con cebadores universales EHR16SD/EHR16SR la cual permite amplificar el gen en diferentes microorganismos de la familia *Anaplasmataceae* [24]. A través del análisis de doscientas muestras de ADNg equinas provenientes de localidades de seis entidades federales, utilizando la PCR especie-específica, no se detectó ningún amplicón consistente con un diagnóstico positivo a la infección por *A. phagocytophilum*. Más resaltante aún y en particular en referencia a setenta y ocho muestras (78/200) provenientes de dos de los Estados (Zulia y Apure), en los que se han reportado casos positivos de *A. phagocytophilum* [4, 11], las cuales al ser analizadas a través de esta PCR especie-específica, resultaron negativas a la infección por este agente causal. Estos resultados, asociados a la ausencia de mórulas en las preparaciones de capa blanca, ratifican que no se encontró evidencias de la presencia de este microorganismo en las 200 muestras equinas procesadas.

CONCLUSIONES

La observación al microscopio de frotis de capa blanca teñidos y los ensayos de PCR basados en el gen *p44* de *A. phagocytophilum* son herramientas de gran utilidad para el estudio y caracterización de la anaplasmosis equina. Se sugiere incluir un mayor número de muestras que permitan confirmar el diagnóstico y caracterización de *A. phagocytophilum* en el país utilizando los conocimientos de la biología molecular. Se podría considerar la realización de un mayor muestreo en poblaciones equinas pertenecientes a los estados Apure y Zulia, cuna de los primeros estudios realizados en relación a este agente infeccioso.

AGRADECIMIENTO

Se agradece el financiamiento parcial de esta investigación al subproyecto 4 del Proyecto G-2007001425 del FONACIT y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CDCH de la Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBERTI, A.; ZOBBA, R.; CHESSA, B.; ADDIS, M.F.; SPARAGANO, O.; PINNA-PARGAGLIA, M.L.; CUBEDDU, T.; PINTORI, G.; PITTAU, M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 6418-6422. 2005.
- [2] ALBERTI, A.; SPARAGANO, O.A. Molecular diagnosis of granulocytic anaplasmosis and infectious cyclic thrombocytopenia by PCR-RFLP. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1081: 371-378. 2006.
- [3] ARRAGA-ALVARADO, C.M. Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Reporte de 55 casos. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** II (2): 30-40. 1992.
- [4] ARRAGA-ALVARADO, C.M.; FINOL, G.; PARRA, O.; RIQUELME, M.; SAVEDRA, A. Ehrlichiosis equina en el Estado Zulia, Venezuela. Reporte de 232 casos. **Rev. Cientif. FCV – LUZ.** II (2): 41-52. 1992.
- [5] BALDRIDGE, G.D.; SCOLLES, G.A.; BURKHARDT, N.Y.; SCHLOEDER, B.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** 46: 625-632. 2009.
- [6] BARANDIKA, J.F.; HURTADO, A.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; ESCUDERO, R.; BARRAL, M.; JADO, I.; JUSTE, R.A.; ANDA, P.; GARCÍA-PÉREZ, A.L. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. **Appl. Environ. Microbiol.** 73: 6166-6171. 2007.
- [7] BOWN, K.J.; BEGON, M.; BENNETT, M.; WOLDEHIWET, Z.; OGDEN, N.H. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophilum* in a Rodent-Tick (*Ixodes trianguliceps*) System, United Kingdom. **Emerg. Infect. Dis.** 9: 63-70. 2003.
- [8] BOWN, K.J.; BEGON, M.; BENNETT, M.; BIRTLES, R.J.; BURTHE, S.; LAMBIN, X.; TELFER, S.; WOLDEHIWET, Z.; OGDEN, N.H. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 6: (64) 401-410. 2006.
- [9] BULLOCK, P.M.; AMES, T.R.; ROBINSON, R.A.; GREIG, B.; MELLENCAMP, M.A.; DUMLER, J.S. *Ehrlichia equi* infection of horses from Minnesota and Wisconsin: Detection of seroconversion and acute disease investigation. **J. Vet. Intern. Med.** 14: 252-257. 2000.
- [10] CARRADE, D.D.; FOLEY, J.E.; BORJESSON, D.L.; SYKES, J.E. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. **J. Vet. Intern. Med.** 23: 1129-1141. 2009.
- [11] CASTELLANOS, R.; CANELÓN, J.L.; CALZOLAIO, V.; AGUINACO, F.; LÓPEZ, A.; MONTESINOS, R. Estudio hematológico y detección de hemoparásitos en caballos criollos venezolanos de dos hatos del estado Apure, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV – LUZ.** XX (2): 153-160. 2010.
- [12] CATUREGLI, P.; ASANOVICH, K.M.; WALLS, J.J.; BAKKEN, J.S.; MADIGAN, J.E.; POPOV, V.L.; DUMLER, J.S. ankA: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. **Infect. Immun.** 68: 5277-5283. 2000.
- [13] DUMLER, J.S.; ASANOVICH, K.M.; BAKKEN, J.S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J.E. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*. **J. Clin. Microbiol.** 33: 1098-1103. 1995.
- [14] DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 2145-2165. 2001.
- [15] DUMLER, J.S.; BROUQUI, P. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. **Expert. Rev. Mol. Diagn.** 4: 559-569. 2005a.
- [16] DUMLER, J.S.; CHOI, K.S.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BARAT, N.S.; SCORPIO, D.G.; GARYU, J.W.; GRAB, D.J.; BAKKEN, J.S. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg. Infect. Dis.** 11:1828-1834. 2005b.
- [17] DUNNING-HOTOPP, J.C.; LIN, M.; MADUPU, R.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S.V.; EISEN, J.; SESHADRI, R.; REN, Q.; WU, M.; UTTERBACK, T.R.; SMITH, S.; LEWIS, M.; KHOURI, H.; ZHANG, C.; NIU, H.; LIN, Q.; OHASHI, N.; ZHI, N.; NELSON, W.; BRINKAC, L.M.; DODSON, R.J.; ROSOVITZ, M.J.; SUNDARAM, J.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.; DURKIN, A.S.; GWINN, M.; HAFT, D.H.; SELENGUT, J.D.; SULLIVAN, S.A.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; BENAHMED, F.; FORBERGER, H.; HALPIN, R.; MULLIGAN, S.; ROBINSON, J.; WHITE, O.; RIKIHISA, Y.; TETTELIN, H. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. **PLoS Genet.** 2: e21. 2006.
- [18] ENGVALL, E.O.; PETERSSON, B.; PERSSON, M.; ARTURSSON, K.; JOHANSSON, K.E. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2170-2174. 1996.

- [19] FOLEY, J.; NIETO, N.C.; MASSUNG, R.; BARBET, A.; MADIGAN, J.; BROWN, R.N. Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg. Infect. Dis.** 15: 842-843. 2009.
- [20] FRANZEN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; ABERG, L.; PRINGLE, J. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **J. Vet. Intern. Med.** 29: 232-239. 2005.
- [21] FRANZEN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; KARLSTAM, E.; PRINGUE, J. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. **J. Vet. Intern. Med.** 23: 636-642. 2009.
- [22] FRITZ, C.L.; BRONSON, L.R.; SMITH, C.R.; CRAWFORD-MIKSZA, L.; YEH, E.; SCHNURR, D. Clinical, epidemiologic, and environmental surveillance for ehrlichiosis and anaplasmosis in an endemic area of northern California. **J. Vector. Ecol.** 30: 4-10. 2005.
- [23] GRZESZCZUK, A.; STANCZAK, J.; KUBICA-BIERNAT, B.; RACEWICZ, M.; KRUMINIS-LOZOWSKA, W.; PROKOPOWICZ, D. Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. **Ann. Agric. Environ. Med.** 11: 99-103. 2004.
- [24] INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa island, Japan. **J. Clin. Microbiol.** 38: 4210-4221. 2000.
- [25] KEYSARY, A.; MASSUNG, R.F.; INBAR, M.; WALLACH, A.D.; SHANAS, U.; MUMCUOGLU, K.Y.; WANER, T. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in Israel. **Emerg. Infect. Dis.** 13: 1411-1412. 2007.
- [26] LAURI, A.; MARIANI, P.O. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. **Genes Nutr.** 4: 1-12. 2009.
- [27] LEE, S.H.; KIM, K.T.; YUN, S.H.; CHOI, E.; LEE, G.H.; PARK, Y.S.; CHO, K.H.; YI, S.; KWON, O.D.; KIM, T.H.; KWAK D. Serological and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in horses reared in Korea. **Vet. Med.** 60: 533-538. 2015.
- [28] LIN, Q.; RIKIHISA, Y.; FELEK, S.; WANG, X.; MASSUNG, R.F.; WOLDEHIWET, Z. *Anaplasma phagocytophilum* has functional msp2 gene that is distinct from p44. **Infect. Immun.** 72: 3883-3889. 2004.
- [29] MADIGAN, J.E.; GRIBBLE, D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 190: 445-448. 1987.
- [30] MADIGAN, J.E.; HIETALA, E.; CHALMERS, S.; DEROCK, E. Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of northern California. **JAVMA.** 196: 1962-1964. 1990.
- [31] MADIGAN, J.E.; BARLOUGH, J.E.; DUMLER, J.S.; SCHANKMAN, N.S.; DEROCK, E. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. **J. Clin. Microbiol.** 34: 434-435. 1996.
- [32] MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N. Ehrlichial diseases. **Vet. Clin. North Am.** 16: 487-498. 2000.
- [33] METZGER, F.L.; REBAR, A. Three-minute peripheral blood film evaluation: Preparing the film. 2004. Idexx Laboratories. EUA. En línea: http://www.idexx.de/pdf/de_de/smallanimal/education/3minute-blood-film-evaluations.pdf. 29.10.16
- [34] PSIFIDI, A.; DOVAS, C.I.; BRAMIS, G.; LAZAU, T.; RUSSEL, C.L.; ARSENOS, G.; BANOS, G. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome typing and long-term DNA banking using blood samples. **PLoS ONE** 10 (1): e0115960. 2015.
- [35] PUSTERLA, N.; MADIGAN, J.E. Equine granulocytic anaplasmosis. **J. Equine Vet. Sci.** 33: 493-496. 2013.
- [36] PUSTERLA, N.; MADIGAN, J.E. *Anaplasma phagocytophilum* infection. In: **Equine Infectious Diseases**. Sellon, D.C.; Long M. (Eds.). 2nd Ed. Saunders, Philadelphia. Pp: 344-347. 2014.
- [37] RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. **Nature Rev.** 8: 328-339. 2010.
- [38] RIKIHISA, Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clin. Microbiol. Rev.** 24: 469-489. 2011.
- [39] RIZZOLI, A.; SILAGHI, C.; OBIEGALA, A.; RUDOLF, I.; HUBÁLEK, Z.; FÖLDVÁRI, G.; PLANTARD, O.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BONNET, S.; ŠPITALSKÁ, E.; KAZIMÍROVÁ, M. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. **Front. Public Health.** 2: 251-276. 2014.
- [40] ROSALES, R.; RANGEL-RIVAS, A.; ESCALONA, A.; JORDAN, L.S.; GONZATTI, M.I.; ASO, P.M.; PERRONE, T.; SILVA-ITURRIZA, A.; MIJARES, A. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using competitive-inhibition ELISA and PCR. **Vet. Parasitol.** 196: 37-43. 2013.
- [41] SARKAR, A.; SAHA, M.; ROY, P. Detection of 232bp virulent gene of pathogenic *Aeromonas hydrophila* through PCR based technique: (a rapid molecular diagnostic approach). **Adv. Microbiol.** 3: 83-87. 2013.

- [42] SCHARF, W.; SCHAUER, S.; FREYBURGER, F.; PETROVEC, M.; SCHAARSCHMIDT-KIENER, D.; LIEBISCH, G.; RUNGE, M.; GANTER, M.; KEHL, A.; DUMLER, S.; GARCIA-PEREZ, A.L.; JENSEN, J.; FINGERLE, V.; MELI, M.L.; ENSSER, A.; STUEN, S.; VON LOEWENICH, F.D. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* AnkA gene clusters. **J. Clin. Microbiol.** 49: 790-796. 2011.
- [43] SCHVARTZ, G.; EPP, T.; BURGESS, H.J.; CHILTON, N.B.; PEARL, D.L.; LOHMANN, K.L. Seroprevalence of equine granulocytic anaplasmosis and Lyme borreliosis in Canada as determined by a point-of-care enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Can. Vet. J.** 56: 575-580. 2015.
- [44] SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.L.; ZERVOS, M.J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 19: 512-530. 2006.
- [45] STUEN, S.; GRANQUIST, E.G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum* -a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Front. Cel. Infect. Microbiol.** 3: 1-33. 2013.
- [46] STÜRENBURG, E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. **Ger. Med. Sci.** 7: Doc06. 2009.
- [47] SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **J. Clin. Microbiol.** 39: 90-93. 2001.
- [48] SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. Author's correction. **J. Clin. Microbiol.** 40: 3887. 2002.
- [49] SWANSON, S.J.; NEITZEL, D.; REED, K.D.; BELONGIA, E.A. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. **Clin. Microbiol. Rev.** 19: 708-727. 2006.
- [50] TORINA, A.; ALONGI, A.; NARANJO, V.; ESTRADA-PEÑA, A.; VICENTE, J.; SCIMECA, S.; MARINO, A.M.F.; SALINA, F.; CARACAPPA, S.; DE LA FUENTE, J. Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a mediterranean ecosystem. **Appl. Environ. Microbiol.** 74: 7578-7584. 2008.
- [51] WALKER, D.H. Consensus Workshop on diagnosis of human ehrlichioses. **Amer. Soc. Rickettsiol. Newslett.** 2: 1-8. 1999.
- [52] WANG, X.; RIKIHISA, Y.; LAI, T.A.; KUMAGAI, Y.; ZHI, N.; REED, S.M. Rapid sequential changeover of expressed *p44* genes during the acute phase of *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses. **Infect. Immun.** 72: 6852-6859. 2004.
- [53] YANG, S.; RAMACHANDRAN, P.; HARDICK, A.; HSIEH, Y.; QUIANZON, C.; KUROKI, M.; HARDICK, J.; KECOJEVIC, A.; ABEYGUNAWARDENA, A.; ZENILMAN, J.; MELENDEZ, J.; DOSHI, V.; GAYDOS, C.; ROTHMAN, R.E. Rapid PCR-based diagnosis of septic arthritis by early Gram-type classification and pathogen identification. **J. Clin. Microbiol.** 46: 1386-1390. 2008.