

# Uso del PCR como diagnóstico de Hemoplasmas en Encarnación y Asunción

Autores: Rossana Centurión<sup>1</sup> Joanne Messick<sup>2</sup>

## Resumen

El objetivo del trabajo consiste en la detección de hemoplasmas felinos por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) en gatos domésticos de la Ciudad de Encarnación y Asunción. Para ello se extrae el ADN de 42 muestras de sangre, luego se utilizó una prueba para la confirmación de ADN en aquellas muestras, cumpliendo este fin el GAPDH como la prueba tamiz, dando como resultado 28 muestras con ADN (66,66%) de este grupo un total de 2 fueron positivas a hemoplasmas felinos, específicamente a *Mycoplasma haemominutum* (4,7%) demostrando la presencia de esta cepa en la población analizada.

## Palabras clave:

*Mycoplasma haemominutum*, PCR, bacteria, felinos.

## Summary

The aim of this study was the Hemotropic *Mycoplasma* detection by Polymerase chain reaction technique in domestic cats of Encarnacion and Asuncion cities. DNA was extracted from 42 blood samples (66,66%) then, 28 samples using GAPDH as a housekeeping gene were positive. For *Mycoplasma haemominutum* 2 samples (4,76%) were amplified, demonstrating the presence of this strain in the analyzed population.

**Key words:** Hemotropic *Mycoplasma*, PCR, bacterium, feline

<sup>1</sup>Dra. en Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción  
mail: rosscenturion12@hotmail.com

<sup>2</sup> Ph.D., Departamento de Patobiología Comparativa Universidad Purdue, Estados Unidos,  
mail: jmessic@purdue.edu

Recibido: 29/07/2014 Aceptado: 17/10/14

## Introducción

Los Hemoplasmas (Mycoplasmas) son bacterias gram negativas sin pared celular que infectan la superficie de los glóbulos rojos. Dos cepas son consideradas las causantes de la enfermedad; *Mycoplasma haemofelis* (Mhhf) y *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. (Tanahara, 2010).

El problema presente en los Micoplasmas es que no pueden ser fácilmente detectados por formas convencionales como el hemograma o la evaluación por citología, encontrándose en esta última una baja sensibilidad del 0% para la detección de *Mycoplasma haemofelis* y del 10,3% para *Mycoplasma haemominutum*; al comparar con un diagnóstico realizado por PCR (Nibblet, 2009).

El PCR ofrece la ventaja de ampliar un fragmento del ADN de estos microorganismos a niveles detectables, para luego ser procesados por protocolos y equipamiento adecuado, interpretándose como resultado positivo al test de PCR la presencia del genoma patógeno en la muestra analizada ( Viljoen, 2005), además de consistir en el método más sensible y específico para la detección de este tipo de organismos (Sykes, 2010).

Actualmente en el país aún no se cuentan con datos de su presencia a través de esta técnica, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue demostrar la existencia de los Micoplasmas en felinos domésticos de la ciudad de Encarnación y Asunción

comprendidos entre los tres hasta diez años de edad por el método de PCR.

Una vez alcanzado este punto, el siguiente objetivo es determinar cuál de los tres tipos de Micoplasmas; *Mycoplasma haemofelis* (Mhhf), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* y *Candidatus Mycoplasma turicensis* (Cmt) es la cepa encontrada en las muestras obtenidas a través de la extracción de ADN a partir de sangre entera sin anticoagulante.

Con el hallazgo de estos organismos, se aportará no solo la identificación propiamente dicha sino también una base para futuros estudios de prevalencia, ya que existen datos de que estos microorganismos están presentes en Sudamérica, como en Lima - Perú, mayor al 5% (García, 2005); 13,3% en Chillán - Chile (Cruz-Zuleta, 2005) y de 26% en Brasil, región metropolitana de Belén (Franco, 2008).

En Canadá, Estados Unidos, Sudáfrica e Inglaterra los datos van de 10 - 40% (Tanahara, 2010).

En cuanto a las implicancias en salud pública se ha detectado la presencia de *Mycoplasma haemofelis* a través de PCR en un paciente humano infectado con VIH en Brasil, quien además estuvo coinfectado con *Bartonella henselae* sugiriendo el potencial zoonótico de estos organismos, en pacientes humanos con anemia marcada y lupus eritematoso, por lo que el manejo de sangre de gatos infectados debe realizarse con precaución. (Sykes, 2010).

## Materiales y Métodos

Se seleccionaron animales de la especie felina, sin distinción de sexo, raza o sintomatología de hemoplasmosis, así como animales jóvenes desde los 3 meses y adultos de 10 años que acudieron a clínicas privadas de las mencionadas ciudades desde marzo 2010 hasta agosto del 2011.

De 1ml de sangre entera recolectada de la vena cefálica del antebrazo se realizó la centrifugación de las muestras para la extracción de ADN a partir de suero con el kit comercial listo para usar DNeasy Blood and Tissue kit 250, Qiagen®. Para la

verificación de ADN en las muestras se utilizó al GAPDH como una prueba tamiz o housekeeping gene. Las secuencias de primers utilizados con 5µl de ADN fueron:

Primer: F 5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT3'

Primer: R 3' CCAAAGTTGTCATGGATGACC5'. Las condiciones para la reacción de PCR fueron 5µl de buffer, 1,5µl de solución de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µl de Primer: F 5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT3', 0,5µl de Primer: R 3' CCAAAGTTGTCATGGATGACC5' 11,8 µl de agua Milli-Q y 1µl de 5U/µl de Taq Polimerasa. Los ciclos fueron: desnaturalización a 95°C por 2 min; 34 ciclos de desnaturalización (94°C por 45 segundos cada uno), alineamiento (55°C por 45 segundos cada uno), extensión (72°C por 45 segundos) y extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de 399 bp fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción en bromuro de etidio.

Las muestras en las cuales se detectó la presencia de ADN fueron sometidas a tres protocolos para la detección de *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemonitum* y *Candidatus Mycoplasma turicensis*, dando positivo al segundo tipo y en el que se utilizó el siguiente protocolo para la detección de la cepa *Candidatus Mycoplasma haemonitum*, utilizando primers obtenidos a partir de la amplificación del gen 16 S rRNA del género *Mycoplasma*, siendo las secuencias; Primer CALI F1 5' GCATAATGTCGCAATC 3' Primer CALI R1 3' GTTCAACTACTTCTCCC 5'. Las condiciones para la reacción de PCR fueron 5µl de ADN se adicionó a una solución de mastermix que contuvo, 5 µl de buffer, 1,5µl de solución de 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µl de 10mM de dNTP, 0,5 µl de 10 pmol de Primer: CALI F1 5' GCATAATGTCGCAATC 3', 0,5 µl de 10 pmol de Primer: CALI R1 3' GTTCAACTACTTCTCCC 5', 11,75 µl de agua Milli-Q y 0,25 µl de 5U/µl Taq polimerasa.

Los ciclos utilizados fueron: desnaturalización a 95°C por 2 minutos; 37 ciclos de desnaturalización (94°C por 45 segundos cada uno), alineamiento (54°C por 45 segundos), extensión (72° C por 45 segundos) y extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de 192 pb fueron resueltos en gel de agarosa al 1,5%. Como control positivo se utilizó

ADN de un felino infectado con *Mycoplasma haemominutum* y como control negativo agua Milli-Q desionizada y destilada.

## Resultados y Discusión

Un total de 42 animales de la especie felina formaron parte del estudio con la finalidad de detectar Hemoplasmas por la técnica de PCR, de los 42 felinos, fueron 17 hembras (40%) y 25 machos (60%), 4 provenientes de la ciudad de Asunción y 38 de la Ciudad de Encarnación. Luego de la realización del protocolo de PCR para GAPDH, se detectaron ADN en 28 muestras (66,66%) las muestras que amplificaron 399 pb fueron consideradas con presencia de ADN, para luego someterlas a los protocolos de PCR para la determinación de la cepa de *Mycoplasma haemominutum* (Mhm). Las muestras que amplificaron 192pb fueron consideradas positivas a *Mycoplasma haemominutum* (Mhm). (FIGURA)

La Hemobartonelosis suele ser una enfermedad secundaria a otras patologías, en especial en aquellas inmunosupresoras. *Mycoplasma haemominutum* es el más prevalente de los tres tipos de Hemoplasmas, con porcentajes que van de un quinto (20%) a un medio (50%) de gatos que presentan o no signos clínicos, aumentando la prevalencia de infección en gatos mas viejos. En cuanto a la prevalencia de *Candidatus Mycoplasma turicensis* es similar a *Mycoplasma haemofelis* con estudios mostrando un 0,5% a 10% en gatos enfermos con potencial patogénico aparentemente bajo. (Sykes, 2010).

Es conveniente hacer notar las diferencias de prevalencia en los tres tipos de *Mycoplasmas* para la discusión de los resultados obtenidos, debido a que estos se acercaron al rango de prevalencia. Anteriormente se había señalado que *Mycoplasma haemominutum* demostraba ser en la mayoría de los estudios basados en PCR el más prevalente de los *Mycoplasmas*, por lo que se demuestra en este trabajo que *Mycoplasma haemominutum* fue el tipo que más sobresalió en las muestras analizadas, y el resultado de 4,76%, bajo en comparación a el promedio de los datos obtenidos se debe a la baja cantidad de muestras con ADN obtenidas.

## Conclusión

Se seleccionaron felinos domésticos de la Ciudad de Encarnación y Asunción con el objeto de detectar la presencia de Hemoplasmas felinos por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa, así como el tipo de Hemoplasma por medio de la extracción de ADN a partir de sangre entera sin anticoagulante, de un total de 42 felinos, 2 resultaron positivos a Hemoplasmas.

Se recomienda realizar un estudio de la población felina existente en un área geográfica determinada, como Encarnación, para estudios de prevalencia e incidencia en el futuro.

## Bibliografía

- BARKER, E.N.; HELPS, C.R.; HEESOM, K.J.; et al. 2010. Detection of humoral response using a recombinant heat shock protein 70. Dnak. of *Mycoplasma haemofelis* in experimentally and naturally hemoplasma-infected cats. Clinical and Vaccine Immunology. American Society for Microbiology. Estados Unidos 17 (12): 1926 - 1932.
- CRUZ ZULETA, A. J.; MERINO MUÑOZ, I.; ISLAS LETELIER, A. 2005. Detección de *Mycoplasma haemofelis* y *Candidatus Mycoplasma haemominutum* a través de PCR en gatos de la comuna de Chillan. Chillan, Chile: Universidad de Concepcion. 39p.
- FRANCO, MC. 2008. Prevalencia de *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*) en gatos domésticos (*Felis catus* LINNAEUS, 1759) en la region Metropolitana de Belén. Trabajo de Posgrado. Región Metropolitana de Belén, Brasil. Universidade Castelo Branco. Instituto de Posgraduação em medicina veterinária qualittas. 43p.
- GARCIA, G.; RUBIO, A. 2005. Diagnóstico de

Hemobartonelosis en la Ciudad de Lima, Perú. Anuario 2005. Asociación Argentina de Medicina Felina. Buenos Aires. Intermedica. Vol L730p.

- NIBBLET, B.M.; WALDNER, C.; TAYLOR, S.M. et al. 2009. Hemotropic mycoplasma prevalence in shelter and client owned cats in Saskatchewan and a of polymerase chain reaction (PCR). Canada. Can J vet Res. 74 (2): 91- 96.
- SYKES, J.E. 2010. Feline Hemotropic Mycoplasma. In: BARR, S. Veterinary Clinics of North America: Current topics in canine and feline infectious diseases. Estados Unidos: Elsevier Inc. P.1157- 1170.
- TANAHARA, M.; MIYAMOTO, S.; NISHIO, T. et al. 2010. An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. Japon 72(12): 1575-1581.
- TASKER, S. 2010. Hemotropic mycoplasma: What's their real significance in cats?. Journal of Feline Medicine and Surgery. Inglaterra. (12) 5:369- 381.
- VILJOEN, J.G.; NEL, L.; CROWTHER, J. 2005. Molecular Diagnostic PCR Handbook. Países Bajos: Springer. 307p.